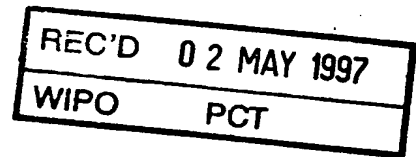


007155003



**OFICINA ESPAÑOLA
DE
PATENTES Y MARCAS**

CERTIFICADO OFICIAL

PRIORITY DOCUMENT

Por la presente certifico que los documentos
adjuntos son copia exacta de solicitud de PATENTE
DE INVENCION número **9600620**, presentada
en este Organismo, con fecha **14 MAR 1996**

Madrid **15 ABR 1997**

El Director del Departamento
de Patentes y Modelos
P.D.

M. MADRUGA REAL



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

NUMERO DE SOLICITUD
P 9600620

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.

25 MAR 14 11 21

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO
MADRID [2.8]

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD
--	--

(4) SOLICITANTE(S)	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA	NOMBRE	DNI
	CYANAMID IBERICA, S.A.		A-28013266

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE	OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Dpto. INFORMACION TECNOLÓGICA REPROGRAFIA Panamá, 1 - Madrid 28071		
DOMICILIO	c/ Cristobal Bordiú, nº 35	TELEFONO	
LOCALIDAD	MADRID	CODIGO POSTAL	[2.8] 0.0.3
PROVINCIA	MADRID	CODIGO PAIS	[E.S.]
PAIS RESIDENCIA	ESPAÑA	CODIGO NACION	[E.S.]
NACIONALIDAD	ESPAÑOLA		

(6) INVENTOR(ES)	(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR	(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
1º) ENJUANES SANCHEZ	Luis	española	ES
2º) IZETA PARMESAN	Ander	española	ES
3º) SMERDOU PICAZO	Cristian	española	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION
VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS.

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.	<input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
--	--

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR	FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(14) REPRESENTANTE	APELLIDOS	NOMBRE	CODIGO
	GOMEZ-ACEBO Y DUQUE DE ESTRADA	Ignacio	[2.4] 7.1 X
DOMICILIO	LOCALIDAD	PROVINCIA	COD. POSTAL
c/ Jorge Juan, 19	MADRID	MADRID	[2.8] 0.0.1

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN	FIRMA DEL FUNCIONARIO
<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS...55 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS...6 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N.º DE PAGINAS...21 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE
<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input checked="" type="checkbox"/> OTROS Diskette conteniendo LISTA DE SECUENCIAS.	

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión: para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

CUMPLIMENTAR LOS TRES EJEMPLARES SALVO ZONAS EN ROJO



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

NUMERO DE SOLICITUD

D 960062

FECHA DE PRESENTACION

96 MAR 14 11 21

- ☒ PATENTE DE INVENCION
☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI

(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
4º)	MENDEZ ZUNZUNEGUI	Ana	ES
5º)	BALLESTEROS JAREÑO	María Luisa	ES
6º)	SANCHEZ SANCHEZ	Carlos M.	ES
7º)	SANCHEZ MORGADO	José Manuel	ES
8º)	PLANA DURAN	Juan	ES

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR:	FECHA:

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NÚMERO DE SOLICITUD

P 9600620

FECHA DE PRESENTACION

96 MAR 14 11:21

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS.

Los vectores comprenden un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y secretoras. El genoma viral defectivo comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además delecciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación. Estos vectores son adecuados para formar un sistema recombinante que comprende (a) dicho vector de expresión, y (b) un virus complementador que proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo. Este sistema es adecuado para la elaboración de vacunas mono- y polivalentes frente agentes infecciosos de distintas especies animales, especialmente cerdos, perros y gatos.

GRAFICO



(31) NUMERO		DATOS DE PRIORIDAD (32) FECHA		(33) PAIS	A1	(12) PATENTE DE INVENCION
(21) NUMERO DE SOLICITUD P 9600620						(22) FECHA DE PRESENTACION 14.12.1995

(71) SOLICITANTE(S) CYANAMID IBERICA, S.A.	NACIONALIDAD ESPAÑOLA
DOMICILIO c/ Cristobal Bordiú, nº 35.- 28003 MADRID.	

(72) INVENTOR(ES) ENJUANES SANCHEZ, Luis; IZETA PARMESAN, Ander; SMERDOU PICAZO, Cristian; MENDEZ ZUNZUNEGUI, Ana; BALLESTEROS JAREÑO, Ma Luisa; SANCHEZ SANCHEZ, Carlos M.; SANCHEZ MORGADO, José Manuel; PLANA DURAN, Juan.

(73) TITULAR(ES)

(11) N.º DE PUBLICACION	(45) FECHA DE PUBLICACION	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)
(51) Int. Cl.			
(54) TITULO VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS.			

(57) RESUMEN (IMPORTACION VOLUNTARIA SIN VALOR JURIDICO) <p>Los vectores comprenden un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y secretoras. El genoma viral defectivo comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además delecciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación. Estos vectores son adecuados para formar un sistema recombinante que comprende (a) dicho vector de expresión, y (b) un virus complementador que proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo. Este sistema es adecuado para la elaboración de vacunas mono- y polivalentes frente agentes infecciosos de distintas especies animales, especialmente cerdos, perros y gatos.</p>

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a unos vectores basados en
genomas virales defectivos recombinantes que expresan
antígenos adecuados para la inducción de respuestas
inmunes sistémicas y secretoras para la prevención de
infecciones en mucosas y a su empleo con fines vacunales
10 junto con un virus complementador adecuado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La obtención de proteínas recombinantes utilizando
vectores de expresión es un hecho conocido desde hace
15 tiempo. En general, los sistemas de expresión
procarióticos y de levaduras son altamente eficaces y
fáciles de usar mientras que los sistemas de expresión que
se utilizan con células eucarióticas superiores plantean
algunos inconvenientes relacionados con bajos niveles de
20 producción de proteínas y con limitaciones en el rango del
hospedador. De los sistemas de expresión existentes para
células eucarióticas superiores, los vectores a base de
baculovirus son los más eficaces en términos de producción
de proteína. Sin embargo, sólo se pueden utilizar en
25 células de insecto que, como es conocido, glicosilan las
proteínas de manera diferente a como lo hacen las células
animales. Adicionalmente, la construcción del virus
recombinante sucede a través de una recombinación
homóloga, lo cual es una técnica laboriosa especialmente
30 cuando se tienen que analizar numerosas variantes
genéticas.

Por otra parte, se conocen vectores basados en virus
ADN adecuados para expresar genes heterólogos. No
obstante, el empleo de vectores basados en ADN presenta
35 numerosos inconvenientes, puesto que se replican en el

núcleo de la célula huésped y pueden llegar a integrarse en dicho genoma, por lo que son poco seguros. Por el contrario, los vectores basados en ARN superan los inconvenientes asociados con el empleo de virus ADN ya que no se replican en el genoma de la célula huésped sino en el citoplasma, la replicación transcurre vía ARN y no vía ADN, y las posibilidades de que se integren en el genoma son muy pequeñas, por lo que los vectores basados en estos virus ARN son más seguros.

Adicionalmente, se conocen partículas defectivas interferentes (DI), que contienen la cápsida del virión y un genoma defectivo, que son unos mutantes subgenómicos de delección generados mayoritariamente a partir de genomas virales infectivos por un error de replicación. En general, el término "partícula DI" se refiere a virus defectivos que carecen de una región del genoma ARN o ADN, contienen las proteínas y antígenos del virus, requieren la coinfección del virus parental infectivo para replicarse (virus complementador) e interfieren específicamente con el virus complementador homólogo al replicarse a sus expensas [Huang y Baltimore, Nature, 226, 325-327 (1970)]. Los genomas DI surgen por reordenamientos del genoma como resultado de "saltos" de la ARN polimerasa de un ARN molde a otro o de un segmento de un ARN molde a otro segmento del mismo. Estos genomas DI, una vez generados, se amplifican a expensas del genoma parental o del virus amplificador que codifica las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación y que debe competir con los genomas defectivos por tales productos.

Se han obtenido y caracterizado partículas DI de algunos coronavirus tales como el virus de la hepatitis murina (MHV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y el coronavirus bovino (BCV), aunque no se han descrito partículas DI derivadas del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). Una de las partículas DI

naturales del MHV se ha utilizado como base para desarrollar un vector de expresión en el que el gen exógeno se inserta bajo el control de una secuencia promotora interna de transcripción [Lin and Lai, J. Virol., 6110-6118, Oct. (1993)].

En general, los vectores conocidos de expresión de genes heterólogos basados en partículas DI presentan una serie de inconvenientes relacionados con su especificidad de especie y órgano diana y con su limitada capacidad de clonaje, lo que restringe las posibilidades de uso de estos vectores tanto en investigación básica como en investigación aplicada a fines terapéuticos, incluyendo los fines vacunales.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de disponer de vectores de expresión de genes heterólogos que superen los inconvenientes mencionados. En particular, sería muy adecuado disponer de unos vectores de expresión de genes heterólogos que tuvieran una elevada seguridad y capacidad de clonaje y pudieran ser diseñados de forma que se pudiera controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

La presente invención proporciona una solución al problema existente que comprende un vector basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa antígenos adecuados para inducir una respuesta inmune y para prevenir infecciones causadas por diversos agentes infecciosos de distintas especies animales. Los vectores de expresión de genes (o secuencias de ADN) heterólogos proporcionados por esta invención tienen una elevada seguridad así como una elevada capacidad de clonaje y pueden ser diseñados de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo, por lo que dichos vectores son adecuados para la formulación de vacunas capaces de conferir protección contra infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de

distintas especies animales.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye un vector basado en un genoma viral defectivo recombinante, que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune, en particular, una respuesta inmune sistémicas y secretora, frente a agentes infecciosos de distintas especies animales, provisto de elevada seguridad y capacidad de clonaje y que puede ser diseñado de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

El genoma viral defectivo que sirve de base para la construcción de dicho vector también constituye un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas que comprende (a) el vector previamente descrito y (b) un virus complementador que facilita las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituyen unas vacunas capaces de inducir protección frente a infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales que comprende el sistema recombinante previamente descrito junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas vacunas pueden ser mono-, o multivalentes dependiendo de si los vectores de expresión presentes en el sistema recombinante expresan uno, o más antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno, o más agentes infecciosos.

Otros objetos proporcionados por esta invención comprenden un método de inmunización de animales que consiste en la administración de dicho sistema recombinante o vacuna, así como un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que

infectan a dichas especies.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estructura del VGPT. El virión
 5 es una partícula esférica formada por una envuelta
 lipídica en cuyo interior se encuentra una molécula de ARN
 de 28,5 kilobases (kb) de cadena sencilla y polaridad
 positiva. Este ARN está asociado a la proteína N formando
 la nucleocápsida. Las proteínas estructurales M y sM se
 10 encuentran incluidas en la membrana. La proteína S se
 agrupa en trímeros y está anclada en la parte externa de
 la envuelta formando los peplómeros.

La Figura 2 muestra la organización genómica de los
 cuatro coronavirus secuenciados: MHV, IBV, HCV229E
 15 (coronavirus humano 229E) y VGPT. Las fases abiertas de
 lectura que codifican cada proteína se representan a
 escala. En cada genoma se indica con flechas el principio
 de los ARNm que expresa cada virus. El número de ARNm
 expresados por los virus MHV o VGPT puede variar
 20 dependiendo de la cepa viral. En este esquema las flechas
 del VGPT se corresponden con los ARNm que expresa la cepa
 THER-1. Los ARNm son 3'-coterminales y se numeran
 siguiendo un orden decreciente de tamaño.

La Figura 3 muestra la expresión del genoma del VGPT,
 25 cepa THER-1. Se indica la disposición de las fases de
 lectura abierta (ORF) en el genoma: Pol, polimerasa; S,
 sM, M y N, proteínas estructurales; nsp 3a, 3b y 7,
 proteínas no estructurales (la proteína 3b no se produce
 con este virus). El genoma se transcribe en un ARN de
 30 igual longitud pero polaridad negativa (-) que servirá de
 molde para la síntesis de los 7 ARNm (1 a 7). En cada ARNm
 se representa la secuencia común, líder, del extremo 5'
 (cuadrado), el tramo de poliadenina en el extremo 3' y la
 zona que se traduce en cada uno de ellos (líneas gruesas).

35 La Figura 4 muestra la evolución del título de los

aislados del VGPT THER-1 (A) y PUR46-mar 1CC12 (B) con el número de pase a alta multiplicidad de infección (m.d.i.) en células ST.

5 La Figura 5 muestra los resultados del análisis electroforético de los ARNs producidos en células ST infectadas con virus THER-1 pasado 46 veces a alta m.d.i. El número de pase se indica encima de cada canal mientras que las barras a la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular (el ARN genómico del VGPT y
10 marcadores GibcoBRL), expresados en kb. Las barras a la derecha indican los ARNm del VGPT y los ARNs defectivos interferentes (DI). NI, no infectado.

15 La Figura 6 muestra los resultados del análisis en ensayos tipo Northern del ARN de células ST infectadas con el virus THER-1p35.

La Figura 7 muestra los resultados de ensayos tipo Northern del ARN procedente de pases diluidos del virus THER-1-STp41 en células ST.

20 La Figura 8 muestra el efecto del cambio de línea celular en la propagación de los ARNs defectivos A, B y C. El virus THER-1-STp46 se pasó diez veces sin diluir en células IPEC (epitelio intestinal de cerdo), y cinco en células PM (macrófagos porcinos). Figuras 8A y 8B, evolución del título viral con el número de pase en
25 células IPEC y PM, respectivamente. Figura 8C, análisis del ARN de células ST infectadas con virus procedente de los pases 1 y 10 en IPEC (por marcado metabólico con $^{32}\text{P}_i$), o de los pases 1 y 5 en PM (por hibridación con un oligonucleótido complementario al ARN líder).

30 La Figura 9 muestra la encapsidación de los genomas defectivos A, B y C. La Figura 9A muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el que se analiza el ARN extraído de viriones purificados, por medio de centrifugación a través de un colchón de sacarosa del 15%
35 (p/v), del pase 1 y del pase 41. En el canal del pase 41

se observan los ARNs A, B y C, además del genoma parental. Las barras de la izquierda indican marcadores de movilidad en kb. La Figura 9B muestra los resultados del análisis del ARN de viriones del pase 41 purificados por centrifugación a través de colchones o de un gradiente continuo de sacarosa, en ensayos tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder. Como marcadores se utilizaron los ARNs comerciales de GibcoBRL y ARN de viriones del pase 1 (canal a). Canales b y c, ARN extraído de viriones sedimentados a través de colchones de sacarosa del 31% y 15% (p/v), respectivamente. Canales d y e, ARN extraído de virus purificado a través de un colchón continuo de sacarosa, fracciones de densidad 1,20 y 1,15 g/ml, respectivamente.

La Figura 10 muestra la estrategia de clonaje de los ARNs defectivos DI-B y DI-C, donde se observa una representación esquemática de los fragmentos de ADN complementario (ADNc) obtenidos por RT-PCR utilizando como molde ARN genómico de longitud total (A), DI-B (B) y DI-C (C). Las líneas discontinuas indican la ausencia del fragmento previsto debido a su gran tamaño. Los ARNs defectivos se clonaron en cuatro fragmentos solapantes (a, b, c y d), representados por líneas; los números debajo de estas líneas indican el tamaño del fragmento determinado en geles de agarosa. Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores y su polaridad se indican mediante flechas y números. La secuencia de los oligonucleótidos se indica en la Tabla 2. Las cajas rayadas o abiertas en (A) indican la posición relativa de los genes virales: pol, polimerasa; S, M y N, genes estructurales; 3a, 3b, sM y 7, ORFs pequeñas. Los cuadrados negros más estrechos indican la secuencia líder.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de los ARN defectivos. El ARN de viriones

purificados THER-1p1 o THER-1p41 se utilizó como molde en una reacción de RT-PCR con los oligonucleótidos 1 y 2 (a), 3 y 4 (b), 5 y 6 (c) o 7 y 8 (d), cuya secuencia y posición en el genoma parental se indica en la Tabla 2. En cada caso se indica el canal correspondiente al ARN molde del pase 1 (ARN genómico parental) o del pase 41 (ARN genómico parental, DI-A, DI-B y DI-C), y el canal de marcadores de movilidad de DNA (M, GibcoBRL). Los números en negrita indican el tamaño en kb de los productos de amplificación específicos de los ARNs defectivos. ARNs B+C, ARNs B y C purificados de banda en un experimento de fraccionamiento por gel de los ARNs del virus THER-1-STp41. Los ARNs B y C migran muy próximos, y se cortaron como una banda única.

La Figura 12 muestra la secuencia completa del ADNc del ARN DI-C [véase la SEC. ID. N° 24], obtenida por secuenciación de los fragmentos solapantes de clonaje a, b, c y d. El ARN DI-C ha mantenido cuatro regiones discontinuas del genoma parental: I, II, III y IV. Los puntos de unión de estas regiones se indican en la secuencia mediante flechas. Se indica la traducción de las tres ORFs presentes en el genoma DI-C: la ORF de 6,7 kb quimérica que resulta de la fusión de las regiones discontinuas I y II en fase; la mini-ORF de tres aminoácidos que la precede en fase y la ORF que comienza en el AUG del gen S. Se han sombreado las regiones de alta homología con los dominios proteicos descritos en otros coronavirus como responsables de las funciones polimerasa, helicasa y sitio de unión a metales. Las secuencias promotoras de transcripción CTAAAC se indican sombreadas. La zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b (41 nucleótidos) se presenta sombreada, y se indica la secuencia "de deslizamiento" del ribosoma subrayada, y el codón de terminación de la ORF1a encuadrado. En las posiciones 637, 6397 y 6485 se indican los cambios

puntuales respecto al genoma parental. Se indican los nucleótidos presentes en el genoma parental en estas posiciones.

La Figura 13 muestra un diagrama de la estructura del
 5 ARN DI-C. La longitud genómica total se muestra a la derecha de los recuadros. El ARN DI-C contiene cuatro regiones discontinuas (I, II, III y IV) del genoma del VGPT. Estas regiones comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la ORF1b casi completa incluyendo la zona de
 10 solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el principio del gen S, la ORF7 incompleta y la región 3' no traducida. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma parental indican los genes virales. Los números debajo del recuadro indican la posición en el genoma parental de los
 15 nucleótidos flanqueantes de las regiones discontinuas, tomando como referencia la secuencia del aislado VGPT PUR46-PAR. En el recuadro correspondiente al ARN DI-C, la longitud de las cuatro regiones discontinuas se indica en nucleótidos. En el tercer recuadro se indica el número de
 20 nucleótidos derivado de cada gen viral, teniendo en cuenta que las ORFs 1a y 1b se solapan 43 nucleótidos en el genoma parental. Las fases abiertas de lectura que predice el análisis por ordenador se indican por flechas o cabezas de flecha. Pnt, falso lazo (*pseudoknot*); Pol, polimerasa;
 25 Mib, dominio de unión a metales (*metal ion binding*); Hel, helicasa; Cd, dominio coservado (*conserved domain*).

La Figura 14 muestra la estructura del ARN DI-B. El
 ARN DI-B contiene tres regiones discontinuas (I, II y III) del genoma del VGPT que comprenden 2,1 kb del extremo 5'
 30 del genoma, la ORF1b completa incluyendo la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el principio del gen S, el final de la ORF7 y la región no traducida del extremo 3'. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma parental indican los genes virales. Los números
 35 debajo del recuadro indican la posición en el genoma

parental de los nucleótidos flanqueantes de las regiones discontinuas, tomando como referencia la secuencia del aislado VGPT PUR46-PAR. La heterogeneidad en el tamaño de la delección ocurrida entre las regiones discontinuas II y III hace que en realidad exista una población de genomas DI-B. En el segundo y tercer recuadro se indica la longitud en nucleótidos de las tres regiones discontinuas para los genomas de mayor y menor tamaño, respectivamente. En el tercer recuadro se indica el número de nucleótidos derivado de cada gen viral, teniendo en cuenta que las ORFs 1a y 1b se solapan 43 nucleótidos en el genoma parental. Las fases abiertas de lectura que predice el análisis por ordenador se indican por flechas o cabezas de flecha. Pnt, falso lazo (*pseudoknot*); Pol, polimerasa; Mib, dominio de unión a metales (*metal ion binding*); Hel, helicasa; Cd, dominio coservado (*conserved domain*).

La Figura 15 muestra la estructura secundaria y terciaria del ARN en la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b en el ARN DI-C. (A) Estructura que se predice al considerar la región más cercana a la estructura de horquilla que presenta complementariedad con los nucleótidos del lazo para constituir el *pseudoknot* (nucleótidos 2354 a 2358). La secuencia "de deslizamiento" UUUAAC está subrayada. El codón de terminación de la ORF1a se indica encuadrado. (B) Representación esquemática de este *pseudoknot*, que implica dos tramos de complementariedad de secuencias (*stems*: S1 y S2). La secuencia de deslizamiento se representa encuadrada. (C) Un modelo alternativo considerando la secuencia del nucleótido 2489 al 2493 en el plegamiento del *pseudoknot*. Esta estructura contiene un tramo de complementariedad de secuencia (*stem*) adicional. D) Representación esquemática del *pseudoknot*, en la que se señalan los tres *stems*: S1, S2 y S3.

La Figura 16 muestra el mapeo de los ARNs DI por

hibridación con oligonucleótidos específicos para el virus en ensayos tipo Northern. El ARN del virus THER-1-STp41 se fraccionó en geles de agarosa hasta conseguir una separación clara de los ARNs del genoma parental y DI A, B y C. El ARN se transfirió a filtros de nailon que se hibridaron con varios oligonucleótidos marcados con $^{32}\text{P}_i$, que hibridaron con el genoma parental (+), e hibridaron (+) o no (-) con los genomas defectivos. La localización aproximada de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos en el genoma parental se indica con flechas. Su secuencia y posición exactas se indican en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos hibridaron con el genoma parental y dieron los resultados esperados con los ARNs B y C.

La Figura 17 muestra un esquema de obtención de virus vacunales por transfección de células infectadas con ARN DI-C. Se ilustra un esquema prototipo de la construcción que permitió la obtención de ARN DI-C por transcripción *in vitro*, manteniendo los extremos 5' y 3' presentes en la partícula defectiva original. La secuencia del promotor del bacteriófago T7 [PrT7] y la secuencia del ribozima autocatalítico del virus de la hepatitis delta (HDV) [Rz HDV] se clonaron flanqueando la secuencia del ARN DI-C. Sobre la secuencia se señala el punto de corte autocatalítico introducido por la ribozima. Las puntas de flecha indican las posiciones de las secuencias promotoras de transcripción interna mantenidas de forma natural en el ARN DI-C. L, líder. T7 ϕ , señales de terminación de transcripción del bacteriófago T7. Se rescataron viriones que encapsidaron tanto el virus complementador como los genomas defectivos en los que se habían clonado los genes heterólogos, al transfectar los ARNs transcritos *in vitro* sobre células ST infectadas con el virus complementador correspondiente.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención proporciona vectores de expresión de ADNs heterólogos, basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan, al menos, un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune frente a distintos agentes infecciosos de distintas especies animales, provistos de elevada seguridad y capacidad de clonaje y que pueden ser diseñados de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

El término "agente infeccioso" en el sentido utilizado en esta descripción incluye a cualquier agente infectivo viral, bacteriano o parasitario que puede infectar a un animal y ocasionarle una patología.

Bajo el término "especie animal" se incluye a animales de cualquier especie, preferentemente mamíferos y más preferentemente de las especies porcina, canina o felina.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vectores de expresión basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan al menos un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune sistémica y secretora, para la prevención de infecciones en mucosas, diseñados para poder controlar fácilmente la especificidad de especie y su tropismo para infectar mucosas entéricas o respiratorias, por lo que son muy adecuados para inducir inmunidad en mucosas e inmunidad lactogénica, de especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal.

Los vectores de expresión proporcionados por esta invención comprenden un genoma viral defectivo derivado de un virus, preferentemente, un virus con genoma ARN y polaridad positiva, que mantiene los extremos 3' y 5' del virus parental, tiene delecciones internas y depende de un

virus complementador para su replicación. Por tanto, la invención proporciona, además, un genoma viral defectivo que comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además delecciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador que facilita las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. Cuando el virus del que deriva el genoma defectivo es un virus con genoma ARN, el vector de expresión comprende el ADN complementario (ADNc) a dicho ARN defectivo o un ADNc sustancialmente complementario a dicho ARN defectivo.

Los vectores proporcionados por esta invención tienen una elevada capacidad de clonaje, de al menos 18 kb, que es la mayor capacidad de clonaje descrita para un vector basado en virus eucarióticos ARN. Adicionalmente, estos vectores tienen una elevada seguridad puesto que (a) están basados en genomas defectivos, (b) comprenden genomas ARN y no utilizan ADN como intermedio replicativo, y (c) están basados en virus que crecen en el citoplasma de las células infectadas, todo lo cual hace que el genoma defectivo no pueda recombinar con el cromosoma celular.

En una realización particular de esta invención se describe la obtención de genomas ARN defectivos derivados de coronavirus, particularmente, del VGPT. Estos genomas tienen la ventaja adicional de que la frecuencia de recombinación del VGPT es muy baja ($<1 \times 10^9$) lo que hace que el genoma defectivo no recombine con facilidad con el genoma del virus complementador. No obstante, aunque se diese esta recombinación, se obtendría un virus atenuado puesto que la invención contempla la conveniencia de utilizar el mismo virus atenuado tanto como virus complementador como material de partida para la obtención

del genoma defectivo.

Los genomas defectivos que constituyen la base de tales vectores pueden obtenerse por pases seriados sin diluir del virus del que derivan, en distintos sistemas celulares. La frecuencia de generación de partículas DI puede variar mucho en distintos sistemas virus-célula, por lo que es conveniente efectuar los pases con distintos aislados del virus en distintas líneas celulares al objeto de seleccionar el aislado y la línea celular adecuados. Al cabo de un cierto número de pases, se aíslan los virus y se utilizan para analizar los ARNs intracelulares producidos en la infección con el fin de observar la posible aparición de bandas que no correspondan a ningún ARN mensajero (ARNm) viral, en cuyo caso, para analizar la naturaleza de esos nuevos ARNs, subgenómicos o defectivos, se continúan los pases seriados sin diluir con el virus parental. Al cabo de unos pases, se analiza la evolución del patrón de ARNs a lo largo de los pases seriados para lo cual se infectan células del sistema celular adecuado con virus procedentes de distintos pases y se analizan los ARNs producidos por técnicas convencionales, por ejemplo, marcaje metabólico con $^{32}\text{P}_i$ o hibridación con un oligonucleótido apropiado. En el Ejemplo 1 se describe de forma detallada la obtención y caracterización de unos ARNs defectivos derivados del VGPT.

Con los ARN defectivos se pueden obtener los ADNc correspondientes, complementarios o sustancialmente complementarios, a dichos ARN defectivos, mediante una reacción de transcriptasa inversa (RT) y amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), en adelante RT-PCR. A continuación, los ADNc se pueden clonar en plásmidos adecuados, por ejemplo Bluescript II, bajo el control de promotores eficaces. Los plásmidos resultantes contienen el genoma viral defectivo bajo el control de unos elementos reguladores, que contienen las señales de

regulación y control de la replicación así como del inicio y terminación de la transcripción y traducción. Así, estos plásmidos pueden incluir secuencias políA, secuencias de corte auto-catalítico o de reconocimiento de enzimas de restricción que permiten la inserción del ADN heterólogo, y las señales de regulación, control y terminación correspondientes.

Los plásmidos conteniendo el genoma defectivo, o el ADNc correspondiente, así obtenidos se pueden manipular por técnicas de Ingeniería Genética convencionales para clonar, al menos, una secuencia de ADN heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el control del promotor de un gen que esté presente en los genomas defectivos u cualquier otro promotor del virus del que deriva el genoma defectivo o variante de estos promotores con eficiencia aumentada, y de las secuencias reguladoras contenidas en el vector de expresión resultante. En el Ejemplo 2 se describe la generación de vectores de expresión que codifican antígenos que inducen protección frente a distintos virus.

Los vectores de expresión proporcionados por esta invención pueden expresar una o más actividades, tales como uno o más antígenos capaces de inducir respuestas inmunes frente a distintos agentes infecciosos. En una realización particular y preferida, estos vectores expresan, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas.

En una realización particular de esta invención, el clonaje de los genes heterólogos en un plásmido que contenía un ADNc de un ARN defectivo derivado del VGPT, se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen (Ejemplo 2). Alternativamente, las secuencias de ADN

heterólogas se pueden clonar en otras zonas del genoma, por ejemplo en las zonas correspondientes a las ORFs 1, 2 ó 7 del VGPT. A partir de los plásmidos resultantes se expresan ARNs utilizando una polimerasa adecuada, con los que se transforman células apropiadas previamente infectadas con un virus colaborador atenuado, con lo que se pueden rescatar viriones conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo (Figura 17).

Alternativamente, los vectores de expresión de esta invención permiten la expresión de uno o varios genes utilizando la misma estrategia arriba descrita. Para ello, se pueden utilizar uno o varios promotores, o bien un promotor y varios sitios de reconocimiento del ribosoma (IRES), o alternatively varios promotores y un sitio de reconocimiento del ribosoma.

La invención también proporciona un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas que comprende (a) el vector previamente descrito y (b) un virus complementador que facilita las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. Por tanto, se proporciona un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas basado en genomas virales defectivos recombinantes que expresan antígenos capaces de inducir inmunidad sistémica y en mucosas que comprende:

a) un vector recombinante que contiene un genoma viral defectivo para el que, en su caso, se ha obtenido un ADNc manipulable por Ingeniería Genética convencional que tiene las señales de reconocimiento para la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', comprende además unas delecciones internas, y al menos una secuencia de ADN que codifica una actividad, por ejemplo, un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas; y

b) un virus complementador que proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

5 Este sistema, permite la expresión de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune por lo que es adecuado para su empleo con fines vacunales.

10 La invención también proporciona unas vacunas capaces de inducir protección frente a infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales que comprenden (i) el sistema recombinante arriba descrito, constituido por (a) un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo en el que se clona la secuencia de ADN heteróloga y (b) el virus complementador que colabora en la replicación del genoma defectivo, junto
15 con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las vacunas proporcionadas por esta invención son adecuadas, por tanto, para conferir inmunidad contra distintos agentes infecciosos de distintas especies animales.

20 Por "conferir inmunidad", en el sentido utilizado en esta descripción, debe entenderse la puesta en marcha en el organismo receptor (animal a tratar), por parte del sistema recombinante previamente descrito, de los mecanismos adecuados, tales como células presentadoras de antígenos, linfocitos B y T, anticuerpos, sustancias
25 potenciadoras de la respuesta celular (interleuquinas, interferones, etc.), factores de necrosis celulares y sustancias similares que hacen que el animal quede protegido frente a infecciones causadas por agentes patógenos.
30

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden ser monovalentes o multivalentes dependiendo de si los vectores de expresión presentes en el sistema recombinante expresan uno o más antígenos capaces de inducir una
35 respuesta inmune frente a uno o más agentes infecciosos.

La especificidad de especie se controla de forma que el virus complementador exprese la proteína de la envuelta adecuada para ser reconocida por los receptores celulares de la especie correspondiente. Un grupo particular de vacunas proporcionadas por esta invención comprende como virus complementador un coronavirus, preferentemente, un coronavirus porcino, canino o felino.

Estas vacunas son especialmente adecuadas contra agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, que infecten las mucosas de estas especies o las utilicen como vía de entrada.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas monovalentes capaces de proteger cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, y el tropismo se controla expresando la glicoproteína S de un coronavirus.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos porcinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos porcinos: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Parvovirus porcino*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Pasterella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium sp.*, *Serpulina hydrosenteriae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos caninos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente

constituido por antígenos de los siguientes patógenos caninos: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus), virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos felinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos felinos: calicivirus del gato, virus de la inmunodeficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino, rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, Chlamydia psittaci felina, y virus de la leucemia felina.

Las vacunas proporcionadas por esta invención son capaces de proteger a los lechones mediante la inducción de una inmunidad lactogénica, lo que tiene un especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal.

En general, las vacunas proporcionadas por la invención pueden contener una cantidad de antígeno capaz de introducir en el animal a inmunizar un título de virus complementador de, al menos, 10^8 unidades formadoras de placa (ufp).

Como excipiente puede utilizarse un diluyente tal como suero salino fisiológico u otras soluciones salinas similares. Asimismo, estas vacunas pueden contener también un adyuvante de los habitualmente utilizados en la formulación de vacunas, tanto acuoso, tal como hidróxido de aluminio, Quila, suspensiones de geles de alúmina y similares, como oleoso, a base de aceites minerales, glicéridos y derivados de ácido graso, y sus mezclas, por

ejemplo, Marcol 52 (ESSO Española S.A.), Simulsol 5100 (SEPIC) y Montanide 888 (SEPIC).

Estas vacunas también pueden contener sustancias potenciadoras de la respuesta celular (PRC), es decir, sustancias potenciadoras de subpoblaciones de células T helper (Th_1 y Th_2) tales como interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, γ -IFN (gamma interferón), factor de necrosis celular y sustancias similares, que podrían, teóricamente, provocar inmunidad celular en los animales vacunados. Estas sustancias PRC podrían utilizarse en formulaciones vacunales con adyuvantes acuosos u oleosos. También pueden utilizarse otro tipo de adyuvantes que modulan e inmunoestimulan la respuesta celular tales como el MDP (muramil dipéptido), ISCOM (Immuno Stimulant Complex) o liposomas.

La invención proporciona vacunas multivalentes capaces de prevenir y proteger animales de distintas infecciones. Estas vacunas multivalentes pueden elaborarse a partir de vectores de expresión en los que se han insertado las distintas secuencias que codifican los antígenos correspondientes en el mismo vector recombinante o bien construyendo vectores recombinantes independientes que posteriormente se mezclarían para su co-inoculación junto con el virus complementador. Por tanto, estas vacunas multivalentes comprenden un sistema recombinante en el que el propio vector de expresión contiene más de una secuencia de ADN que codifica más de un antígeno o alternativamente, el sistema recombinante utilizado en la elaboración de la vacuna puede contener distintos vectores de expresión que expresen cada uno de ellos al menos un antígeno distinto. La limitación existente en este tipo de vacunas multivalentes radica en que dichos vectores expresen antígenos de agentes infecciosos de una misma especie animal y que el virus complementador sea el adecuado para tal especie.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas capaces de conferir inmunidad a cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, repectivamente. Para ello, los vectores de expresión contenidos en el sistema recombinante de la vacuna deben expresar distintos antígenos de los patógenos porcinos, caninos o felinos previamente mencionados.

Las vacunas de esta invención pueden presentarse en forma líquida o liofilizada y pueden prepararse suspendiendo los sistemas recombinantes en el excipiente. Si dichos sistemas estuvieran en forma liofilizada, el propio excipiente podría ser el reconstituyente.

Alternativamente, las vacunas proporcionadas por esta invención se pueden utilizar en combinación con otras vacunas convencionales, ya sea formando parte de las mismas o bien como diluyente o fracción liofilizada para diluirse con otras vacunas ya sean convencionales o recombinantes.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden administrarse al animal por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol.

La invención también proporciona un método para la inmunización de animales, en particular, cerdos, perros y gatos, contra uno o varios agentes infecciosos de forma simultánea, que comprende la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) de una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

Adicionalmente, la invención también proporciona un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichos animales, que

consiste en la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) a las madres antes de o durante el periodo de gestación, o a su progenie, una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que describen de forma detallada la obtención de genomas virales defectivos, su caracterización, la construcción de plásmidos y su manipulación para obtener los vectores de expresión y la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a diferentes agentes infecciosos de distintas especies.

EJEMPLO 1

GENERACION DE PARTICULAS DEFECTIVAS DERIVADAS DEL VGPT

1.1 Pases seriados a alta m.d.i., sin diluir, de cepas de VGPT

Con la finalidad de promover la generación de partículas defectivas, o la imposición de las ya existentes en pequeña proporción en la población viral, se dieron pases seriados de distintos aislados del VGPT sin diluir en distintos sistemas celulares. Debido a que la frecuencia de generación de partículas DI puede variar mucho en distintos sistemas virus-célula, los pases se llevaron a cabo con distintos aislados del VGPT (THER-1 y PUR46-mar 1CC12) en las líneas celulares ST (swine testis, células epiteliales de testículo de cerdo).

La cepa THER-1 [Transmisible gastroenteritis coronavirus Helper Entérico y Respiratorio, estirpe 1] es un mutante atenuado por 20 pases en cultivos de células ST derivado de la cepa PUR46-MAD [Sánchez y col., Virology 174, 410-417 (1990)]. La cepa PUR46-mar 1CC12 también se describe en Sánchez y col., [citado supra].

Cada cepa de VGPT se pasó sin diluir 35 veces en células ST. La m.d.i. del primer pase en cada uno de los tres casos fue de 100 ufp por célula. El sobrenadante de cada pase se recogió entre las 20 y las 48 horas post-infección (h.p.i.), cuando se observó un efecto citopático claro, normalmente cuando dicho efecto alcanzaba a más de la mitad de la monocapa celular, y la mitad del volumen de este sobrenadante se utilizó en la infección del pase siguiente. La variación del título viral con el número de pase se representa en la Figura 4. El título viral osciló en un rango de dos unidades logarítmicas a lo largo de los pases seriados de cada virus. En el caso de la cepa THER-1, el título en los pases 30 a 46 fue menor que el de los treinta primeros pases.

Los virus que habían sido pasados 35 veces en células ST se utilizaron para analizar los ARNs intracelulares producidos en la infección. Los ARNs, marcados metabólicamente con $^{32}\text{P}_i$ entre las horas 6 y 9 postinfección, se analizaron en un gel de agarosa desnaturalizante [Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)]. En la infección por el virus THER-1-p35 [virus de la cepa THER-1 pasados 35 veces a alta m.d.i.] se apreciaron tres bandas intensas que no correspondían a ningún ARNm viral, situadas entre las bandas correspondientes al ARN genómico y al mensajero del gen S (Figura 5). Para analizar la naturaleza de estos nuevos ARNs subgenómicos se continuaron los pases seriados sin diluir con la cepa THER-1. Al cabo de 46 pases, se analizó la evolución del patrón de ARNs a lo largo de los pases seriados. Para ello, se infectaron células ST con virus procedentes de varios pases y los ARNs producidos, marcados metabólicamente, se analizaron en un gel de agarosa desnaturalizante (Figura 5). Mientras que en los primeros pases solamente se detectaron los ARNs genómico y

mensajeros subgenómicos virales, en el pase 30 se detectaron tres nuevos ARNs de 22, 10,6 y 9,7 kb (ARNs A, B y C, que en la Figura 5 aparecen como DI-A, DI-B y DI-C, respectivamente). Estos ARNs subgenómicos se mantuvieron de forma estable a lo largo de los 15 pases siguientes, interfiriendo notablemente con la replicación del ARN genómico y la síntesis de los ARNm del virus complementador (Figura 5, canales 30 a 45). Estos resultados indican que los tres ARNs generados o amplificados en los pases seriados sin diluir son estables y que al menos uno de ellos es interferente.

1.2 Caracterización de los ARNs subgenómicos

1.2.1 Análisis de los extremos y las regiones internas

Para determinar si los ARNs subgenómicos A, B y C tenían la estructura estándar de los ARNs defectivos de coronavirus, en particular, si conservaban los extremos 5' y 3' del genoma silvestre y su pequeño tamaño era debido a deleciones internas, se hicieron varios ensayos de hibridación con sondas específicas para el virus. Para ello, el ARN de las células infectadas con el virus THER-1-STp35 [virus de la cepa THER-1 pasados 35 veces en células ST] se extrajo y se analizó su hibridación con sondas específicas virales en un ensayo tipo Northern [Maniatis et al., citado *supra*] usando oligonucleótidos complementarios al líder y a la secuencia del extremo 3' viral. En cada caso se llevó como control el ARN de células infectadas con virus THER-1-p1 [virus de la cepa THER-1 pasados 1 vez en células ST] y de células ST sin infectar (NI) (canales 1 y 2 de cada filtro, respectivamente). Los oligonucleótidos utilizados como sonda son complementarios al ARN líder (posiciones 66-91 del extremo 5' del genoma parental); a la región no traducida del extremo 3' (nucleótidos 28524-28543 del extremo 5' del genoma parental) y a los genes

estructurales M y N (posiciones 97-116 y 5-24 a partir del AUG iniciador de cada gen, respectivamente). Las barras de la derecha indican las posiciones de los ARNm virales y los ARNs subgenómicos A, B y C.

5 Como puede apreciarse en la Figura 6, los dos oligonucleótidos hibridaron con todos los ARNm del virus parental, y también detectaron los ARNs A, B y C, lo que indica que estos ARNs han sufrido delecciones internas y han mantenido los extremos. Como una primera aproximación
10 al estudio de qué secuencias genómicas estaban presentes en estos ARNs, el ARN de células infectadas se hibridó con oligonucleótidos complementarios a los genes de las proteínas estructurales virales S, M y N. Ninguno de ellos hibridó con los ARNs defectivos, sugiriendo que los genes
15 de las proteínas estructurales estaban deleccionados. Por tanto, los ARNs subgenómicos A, B y C, son genomas defectivos, mantienen los extremos del virus parental y tienen delecciones internas.

20 1.2.2. Propagación de los ARNs A, B y C

 Para comprobar que los ARNs A, B y C son genomas defectivos, dependientes del virus parental para su propagación en cultivo, se infectaron células ST con el virus THER-1-STp41 [virus de la cepa THER-1 pasados 41
25 veces en células ST] a distintas m.d.i.: 10, 0,1, 0,01 y 0,001 ufp/célula. El virus resultante de este pase, recogido a las 10 h.p.i., se tituló y se amplificó en un segundo pase en células ST, que a su vez se utilizó para infectar nuevas células y extraer el ARN citoplásmico
30 [Maniatis et al., citado supra]. El ARN se analizó en un ensayo tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos. Las m.d.i. se indican sobre cada canal (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} y 10 ufp/célula). Como control negativo se
35 incluyó el ARN procedente de una infección de células ST

con el virus THER-1-p1, que no contiene ARN subgenómicos, a una m.d.i. de 10 ufp/célula (primer canal). En el canal correspondiente a la infección del virus THER-1-STp41 a una m.d.i. de 10 ufp/célula, control positivo, se señalan los ARNs genómico (ARNm 1); los ARN defectivos A, B y C [representados como DI-A, DI-B, DI-C] y el correspondiente al gen S (ARNm 2).

Se puede observar que cuando la m.d.i. del primer pase (el "cuello de botella" en este experimento, ya que los pases siguientes son de amplificación) es de 0,1 ufp/célula o menor, los ARNs A, B y C se pierden, en condiciones en que el ARN genómico y los ARNm del virus se detectan en las proporciones esperadas (Figura 7). Los tres ARNs defectivos se mantienen cuando la m.d.i. es de 10 ufp/célula. Dado que los ARNs A, B y C se encuentran en mayor proporción que el ARN genómico en el virus THER-1-p41 utilizado en la infección, estos resultados indican que la replicación o propagación de estos ARNs requiere que las células sean infectadas por virus defectivo y también por el virus complementador. Los ARNs A, B y C requieren, por tanto, funciones del virus complementador que han de ser aportadas *en trans*. Por consiguiente, los ARNs A, B y C son genomas defectivos, que dependen de un virus complementador para su propagación.

1.2.3 Generación, amplificación, propagación e interferencia in vitro de los ARN DI en otra línea celular.

Debido a que la generación, amplificación, propagación e interferencia *in vitro* de los ARN DI es específica de la línea celular se ha estudiado el efecto que podría tener un cambio de línea celular en los ARNs defectivos. Para ello, el virus THER-1-STp46 (el virus THER-1 pasado 46 veces a alta m.d.i. en células ST) se sometió a una nueva serie de pases sin diluir, en células

epiteliales de intestino de cerdo (IPEC) y macrófagos porcinos (PM). En la Figura 8 se representa la variación del título con el número de pase a lo largo de 10 pases en IPEC (Figura 8A) y 5 pases en PM (Figura 8B). El
 5 rendimiento viral en ambas líneas celulares fue menor que el obtenido en células ST, y se estima que la m.d.i. de cada pase varió entre 20 y 0,2 ufp/célula.

El ARN producido en células ST infectadas con THER-1-STp46-IPECp1 [virus THER-1-STp46 pasado 1 vez en células
 10 IPEC] y THER-1-STp46-IPECp10 [virus THER-1-STp46 pasado 10 veces en células IPEC] se marcó con $^{32}\text{P}_i$ y se analizó en un gel de agarosa desnaturalizante (Figura 8C).

El ARN de células ST infectadas con virus THER-1-STp46-PMp1 [virus THER-1-STp46 pasado 1 vez en células PM]
 15 y THER-1-STp46-PMp5 [virus THER-1-STp46 pasado 5 veces en células PM] se analizó en un ensayo tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder (Figura 8C).

Los resultados se muestran en la Figura 8C, donde puede apreciarse que los tres ARNs defectivos se
 20 mantuvieron en el primer pase en ambas líneas celulares, pero solamente el ARN A persistió a lo largo de, al menos, cinco pases en PM, y de diez pases en IPEC. En ambos casos se señalan las posiciones de los ARNs correspondientes al genoma silvestre (1), ARNs A, B y C (DI-A, DI-B y DI-C
 25 respectivamente) y ARNm 2 (proteína S). En el canal correspondiente al ARN del virus THER-1-STp46-PMp5 se indica la posición del ARN genómico, que sólo se observó cuando el tiempo de exposición de la autorradiografía fue diez veces mayor que el de la que se muestra en la Figura
 30 8C.

1.3 Encapsidación de los genomas defectivos

Para estudiar si los ARNs defectivos tienen la capacidad de encapsidarse, se hizo una purificación
 35 parcial en paralelo de los virus THER-1-STp1 [virus THER-1

pasado 1 vez en células ST] y THER-1-STp41 [virus THER-1 pasado 41 veces en células ST] mediante centrifugación a través de un colchón de sacarosa del 15% peso/volumen. Se extrajo el ARN de los viriones purificados, y se analizó en un gel de agarosa por tinción con bromuro de etidio (Figura 9A). En los viriones del pase 41 se detectaron los ARNs A, B y C con la misma intensidad que el ARN genómico, lo que indica que los tres ARNs defectivos se encapsidan eficientemente.

Para determinar si los genomas defectivos co-encapsidan con el genoma completo o si por el contrario se encapsidan independientemente, se purificó virus THER-1-STp41 por centrifugación a través de colchones de sacarosa de distintas densidades, o a través de gradientes continuos de sacarosa. El ARN de los viriones purificados en cada caso se analizó en un ensayo de tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder (Figura 9B). Cuando la centrifugación se hizo a través de un colchón de sacarosa del 31% (p/v) ($d=1,19$ g/ml), sólo se detectó genoma silvestre en los viriones sedimentados. Sin embargo, cuando se empleó un colchón de sacarosa de menor densidad, 15% (p/v) ($d=1,11$ g/ml), se detectaron los tres ARNs defectivos además del genoma completo. En un gradiente continuo de sacarosa (15-42%, p/v) se logró el enriquecimiento de viriones defectivos en las fracciones superiores del gradiente (densidad cercana a 1,15 g/ml), y de los viriones estándar en las fracciones inferiores (densidad cercana a 1,20 g/ml) como se observa en la Figura 9B, canales d y e. La banda superior en cada canal corresponde a los genomas silvestre y genoma defectivo A (DI-A), y la banda inferior a los genomas defectivos B y C (DI-B y DI-C). Estos resultados indican que los ARNs A, B y C se encapsidan eficientemente, y que los genomas DI-B y DI-C (10,6 y 9,7 kb) lo hacen independientemente del genoma silvestre, en viriones defectivos que son más

ligeros que los viriones estándar.

1.4 Clonaje y secuenciación de los ARN defectivos B y C.

5 Determinación de su estructura primaria.

1.4.1 Síntesis de ADN complementario y amplificación de los ARNs B y C.

El tamaño de los ARNs defectivos B y C se había
estimado por su movilidad en los geles de electroforesis,
10 siendo de 10,6 y 9,7 kb respectivamente. Debido a su gran
tamaño los ARNs defectivos no pudieron ser amplificados en
una sola reacción de transcriptasa inversa y reacción en
cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando iniciadores
complementarios a los extremos del genoma. Para superar
15 esta limitación, los genomas defectivos se amplificaron en
cuatro reacciones independientes, utilizando parejas de
iniciadores que diesen lugar a cuatro fragmentos
solapantes que cubriesen la longitud total del genoma en
cada caso. Estos fragmentos solapantes se designaron a, b,
20 c y d, ordenados desde el extremo 5' al extremo 3' (Figura
10). Se utilizó como molde el ARN del virus THER-1-STp41,
extraído de viriones purificados, que contiene los tres
ARNs defectivos A, B y C además del genoma parental. Como
control se llevó a cabo en paralelo la amplificación del
25 ARN genómico del virus silvestre THER-1.

La secuencia y posición de los oligonucleótidos
utilizados como iniciadores en la reacción de RT-PCR se
indica en la Tabla 2.

Tabla 2
Características de los oligonucleótidos
utilizados como cebadores en las reacciones RT-PCR

5					
	SEC. ID. N°	Polaridad	ORF Coronavirus	Posición en el ARN DI-C ^{b)}	Sitio de Restricción
	1	+	Líder VGPT	15-41	-
	2	-	ORF1a FIPV	1874-1887	-
	3 ^{a)}	+	ORF1a VGPT	1524-1550	<u>XbaI</u>
10	4 ^{a)}	-	ORF1b VGPT	4365-4389	<u>XbaI</u>
	5 ^{a)}	+	ORF1b HCV229E	4097-4114	<u>EcoRI</u>
	6 ^{a)}	-	ORF1b VGPT	7633-7652	<u>EcoRI</u>
	7	+	ORF1b VGPT	7633-7650	-
	8 ^{a)}	-	3'UTR VGPT	9691-9707	<u>SpeI</u>
15	9	+	ORF1b VGPT	8251-8270	-

^{a)}: Se ha incluido un sitio de restricción en 5' para facilitar su posterior clonaje.

^{b)}: La posición del oligonucleótido en la correspondiente ORF es en relación con la secuencia mostrada en la Figura 12.

20 La amplificación por RT-PCR con los iniciadores 1 y 2, del ARN del virus THER-1-STp41 y del ARN del virus parental THER dio lugar a un producto de PCR mayoritario de 1,9 kb (Figura 11, fragmento a). Las bandas minoritarias observadas en esta reacción son debidas a

25 hibridaciones inespecíficas, ya que aparecen en los dos canales. Esta misma reacción de RT-PCR se hizo a partir de un fragmento de agarosa que contenía los ARNs DI-B y DI-C juntos procedentes de una purificación por gel, obteniéndose el mismo resultado. Esto indica que el

30 fragmento a es común a todos los ARNs DI, y corresponde a la región de 1,9 kb del extremo 5' del genoma silvestre del VGPT.

La amplificación con los oligonucleótidos 3 y 4 dio lugar a un producto de PCR único de 2,8 kb a partir del

35 ARN del virus THER-1-STp41 (Figura 11, fragmento b). No se

obtuvo ningún producto de PCR a partir del ARN del virus THER-1 control, ya que el tamaño del producto esperado era de 12 kb. De estos datos se deduce que al menos un genoma defectivo tiene un fragmento *b* de 2,8 kb, y los otros tienen este mismo fragmento o uno mayor que no es detectable en las reacciones de PCR por su gran tamaño.

Los oligonucleótidos 5 y 6, separados 4,6 kb en el genoma parental, dieron lugar a dos productos diferentes de 3,5 y 4,6 kb a partir del ARN del virus THER-1-STp41 (Figura 11, fragmento *c*). El producto de 4,6 kb se obtuvo también a partir del ARN del virus silvestre llevado como control. Estos resultados sugieren que el fragmento *c* en al menos un genoma defectivo (probablemente en el genoma defectivo más abundante, DI-C) contiene una delección, dando lugar por PCR a un fragmento de 3,5 kb. El fragmento de 4,6 kb se deriva del genoma parental presente en la población de ARNs del virus THER-1-STp41, y de aquellos genomas defectivos que hayan conservado esta región del genoma.

La amplificación por RT-PCR con los iniciadores 7 y 8 del ARN genómico del virus parental no generó ninguna banda (Figura 11, fragmento *d*), ya que la separación entre estos oligonucleótidos es de 9,5 kb en el genoma completo (Figura 10). En contraste, se observaron dos bandas muy intensas de 1,9 y de 2,1 kb cuando se utilizó como molde el ARN del virus THER-1-STp41. Estas bandas se observan como una banda ancha continua, correspondiente al fragmento *d* (Figura 11), probablemente porque co-migran con un conjunto de bandas minoritarias en el entorno de la banda de 1,9 kb, que dificultan la resolución en los geles. Se ha observado heterogeneidad de tamaños en el fragmento *d* de clonaje (véase más adelante).

1.4.2 Asignación de los productos de amplificación [a, b, c y d] a los distintos ARNs defectivos.

Con objeto de asignar los fragmentos *d* de tamaño variable entre 1,9 y 2,1 kb a los distintos genomas defectivos, el ARN del virus THER-1-STp41, que se había utilizado como molde, se fraccionó en un gel de agarosa hasta que se logró una separación clara de las bandas correspondientes a los ARNs del genoma silvestre, DI-A, DI-B y DI-C. Las bandas correspondientes a cada uno de estos cuatro ARNs se cortaron independientemente y se usaron como molde en la reacción de amplificación de RT-PCR con los oligonucleótidos 8 y 9. A partir del ARN genómico purificado de banda no se obtuvo ningún producto de PCR. A partir del ARN DI-B se obtuvo un producto de PCR predominante de 1,9 kb, aunque se obtuvieron también DNAs menos abundantes, de tamaño variable próximo a 1,9 kb, que indican una cierta heterogeneidad en esta zona. La amplificación del ARN DI-C dio lugar a un producto de PCR mayoritario de 2,1 kb. Estos resultados permitieron asignar el fragmento de 1,9 kb al ARN defectivo B, y el fragmento de 2,1 kb al ARN DI-C.

Una vez asignados los fragmentos *d*, los fragmentos *c* de 3,5 y 4,6 kb obtenidos con los iniciadores 5 y 6 se asignaron a los ARNs defectivos C y B, respectivamente, ya que la suma de los fragmentos *a* a *d* resultantes de esta asignación coincidía en cada caso con los tamaños de los ARNs B y C estimados por movilidad.

Una vez determinada la secuencia completa de los genomas B y C, se comprobó la asignación de fragmentos mediante la amplificación de cada ARN purificado de banda, utilizando oligonucleótidos que flanqueaban deleciones específicas. La asignación de fragmentos se confirmó también mediante ensayos tipo Northern usando oligonucleótidos que mapeaban en las regiones de la DI-B que no estaban presentes en la DI-C, y viceversa.

1.4.3 Clonaje y secuenciación de los fragmentos solapantes

a, b, c y d.

Los cuatro fragmentos de ADN solapantes a (1,9 kb), b (2,8 kb), c (3,5 kb) y d (2,1 kb) complementarios al ARN C se clonaron en Bluescript SK⁻. Se secuenciaron al menos dos clones procedentes de reacciones de RT-PCR independientes. La secuencia de aquellas posiciones que no coincidían en los distintos clones (posiblemente errores de la polimerasa Taq) se secuenciaron directamente de los productos de PCR correspondientes no clonados. De esta forma se determinó la secuencia consenso del ARN DI-C. Se obtuvo una media de 1 error de la polimerasa Taq cada 1,2 kb copiadas. La secuencia completa del genoma DI-C se indica en la Figura 12.

La secuencia completa del ARN DI-C que se obtuvo de esta forma se comparó con la secuencia de las ORFs 1a y 1b del virus PUR46-PAR, [Eleouet et al., Virology 206, 817-822 (1995)], y con la secuencia determinada en nuestro laboratorio de las otras ORFs del virus THER-1. En la secuencia del ARN DI-C completo se encontraron 14 diferencias de nucleótido respecto a la secuencia de la cepa PUR46-PAR. Estas posiciones fueron secuenciadas en la cepa THER-1, el virus parental de los genomas defectivos, para definir los cambios puntuales del ARN genómico defectivo DI-C. La secuencia del ARN DI-C sólo presentó tres diferencias de nucleótido respecto a la secuencia correspondiente del virus parental, y una inserción en la posición 9189, que no afecta a ninguna fase abierta de lectura (Figura 12).

1.4.4 Estructura primaria de los genomas DI-C y DI-B.

Los datos de secuencia indicaron que el genoma DI-C estaba formado por cuatro regiones discontinuas del genoma parental (Figura 13) que comprenden: a) los 2144 nucleótidos del extremo 5' del genoma; b) 4540 nucleótidos que corresponden a la región entre las posiciones 12195-

16734 del genoma parental, que incluye la zona solapante entre las fases abiertas de lectura 1a y 1b, y aproximadamente la mitad 5' de la fase abierta de lectura 1b; c) una región de 2531 nucleótidos que corresponde a las posiciones 17843-20372 del genoma silvestre, y que comprende la mitad 3' de la ORF1b y los 8 primeros nucleótidos del gen S, y d) los 493 nucleótidos del extremo 3' viral.

La estructura primaria del genoma DI-B se determinó por secuenciación de los fragmentos de clonaje a y b (comunes a los del genoma DI-C), c (igual al del genoma parental) y d (específico del genoma DI-B). El genoma DI-B está formado por tres regiones discontinuas del genoma (Figura 14): a) los 2144 nucleótidos del extremo 5' del genoma, común a todos los clones de DI-B, e idéntica a la región I del ARN DI-C; b) una región variable en tamaño, de 8178-8243 nucleótidos que corresponden a las posiciones 12195-20369 a 20436 del genoma parental, y que incluye la zona de solapamiento entre las dos fases abiertas de lectura del gen 1, la ORF1b completa, y los primeros nucleótidos del gen S y c) los 278 a 303 nucleótidos de la región 3' del genoma.

Los clones que constituyen la población designada como genomas DI-B difieren en el tamaño de la delección que tuvo lugar entre las regiones II y III, que comienza al principio del gen S (entre los nucleótidos 6 y 73) y acaba al final del gen 7 (entre los nucleótidos 195 y 233).

La secuencia del extremo 5' del ARN THER-1 parental se determinó por secuenciación directa del ARN, y es 5'-NCUUUUAAG-3'. La naturaleza del primer nucleótido "N" de la secuencia no se ha determinado. Hasta ahora se ha descrito la secuencia del extremo 5' de tres aislados del virus VGPT: PUR46-PAR, PUR46-BRI y FS772/70, [Eleouet et al., citado *supra*; Page et al., Virus Genes 4, 289-301 (1990); Sethna et al., J. Virol. 65, 320-325 (1991)] y

todas difieren en el primer nucleótido. La secuencia del líder de los ARNs defectivos debe ser la misma que la del líder del virus parental, dado el intercambio de líderes que se produce en una infección por coronavirus [Makino et al., J. Virol. 57, 729-737 (1986)].

Los tres ARNs defectivos contienen poliA, dado que se unen a columnas de oligo dT (resultados no mostrados).

1.4.5 Los ARNs B y C conservan la región solapante entre las ORFs 1a y 1b que incluye el motivo responsable de la traslocación (-1) del ribosoma.

De acuerdo con las secuencias asignadas a los genomas DI-C y DI-B, cabe predecir fases abiertas de lectura de 6370 y 10003 nucleótidos respectivamente, que comienzan en el nucleótido 315, contado desde el extremo 5' del genoma. La fase abierta de lectura del ARN DI-C termina en el codón de terminación generado en el sitio de unión de las regiones discontinuas II y III, donde tuvo lugar la delección interna en la fase abierta de lectura 1b, en la posición 6685 del genoma DI-C. La fase abierta de lectura del genoma DI-B termina en el codón de terminación natural de la ORF1b.

Los dos ARNs defectivos han mantenido la zona solapante entre las ORFs 1a y 1b, que incluye la secuencia de deslizamiento y el motivo de estructura terciaria "lazo falso" (*pseudoknot*), responsables de la traslocación (-1) del ribosoma en esta zona [Eleouet y col., citado *supra*]. En la Figura 15 se representan las posibles estructuras secundarias y terciarias del ARN en esta zona. La estructura propuesta para el *pseudoknot* en esta zona por Eleouet y col., es la que se indica en C y D, sin embargo hay otras estructuras posibles (como la indicada en A y B) y se desconoce cuál es la correcta.

Se ha descrito que la traslocación ocurre con una eficiencia del 20% en el VGPT [Eleouet y col., citado

supra] y permite la traducción continua del gen 1. El hecho de que los ARNs DI-B y DI-C (y probablemente el ARN DI-A) hayan mantenido esta región del genoma parental, sugiere que ésta pueda ser necesaria para la replicación del ARN o para la propagación de los genomas.

Hay otras dos fases abiertas de lectura pequeñas en los genomas defectivos DI-C y DI-B. Una de ellas, previa a la fase de lectura larga, codifica un péptido de tres aminoácidos que se encuentra también en el genoma silvestre y de la que se desconoce su función. La otra fase abierta de lectura comienza en los dos casos en el AUG del gen S, y codifica un péptido de 16 aminoácidos en la DI-C, y un péptido de tamaño variable en la DI-B. No se sabe si estas ORFs son funcionales. Las dos únicas secuencias consenso promotoras de transcripción (CUAAAC) del virus que se han mantenido son precisamente las que preceden al gen 1 y al gen S, en los ARNs defectivos B y C. Estas secuencias se señalan en la Figura 12.

En la Figura 16 se muestra el mapeo de los ARNs A, B y C por hibridación con oligonucleótidos específicos para el virus en ensayos tipo Northern. El ARN del virus THER-1-STp41 se fraccionó en geles de agarosa hasta conseguir una separación clara de los ARNs del genoma parental y DI A, B y C. El ARN se transfirió a filtros de nailon que se hibridaron con varios oligonucleótidos marcados con $^{32}\text{P}_i$, que hibridaron con el genoma parental (+), e hibridaron (+) o no (-) con los genomas defectivos. La localización aproximada de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos en el genoma parental se indica con flechas. Su secuencia y posición exactas se indican en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos hibridaron con el genoma parental y dieron los resultados esperados con los ARNs B y C.

Tabla 3

	ON	SEC. ID. N°	Polaridad	Gen en VGPT	Posición en el genoma ^{a)}
	1	10	-	Líder	66-91
5	2	11	-	ORF1a	2151-2170
	3	12	-	ORF1a	6121-6140
	4	13	-	ORF1a	8684-8703
	5	14	-	ORF1a	12261-12280
	6	15	-	ORF1b	14148-14167
10	7	16	-	ORF1b	17363-17381
	8	17	-	ORF1b	18792-18811
	9	18	-	gen S	1055-1074
	10	19	-	gen S	1980-1999
	11	20	-	gen S	3600-3619
15	12	21	-	gen M	97-116
	13	22	-	gen N	5-24
	14	23	-	UTR-3'	28524-28543

^{a)}: La posición en el genoma se indica como el número de bases desde el extremo 5' del genoma viral silvestre para los oligonucleótidos (ON) complementarios al gen 1 (ORF1a y ORF1b) y la región no traducida del extremo 3' (3'-UTR); y desde el primer nucleótido del ATG iniciador del gen correspondiente, al nucleótido 5' del ON en el caso de los que mapean en los genes S, M y N.

EJEMPLO 2

25 GENERACION DE VECTORES DE EXPRESION

Se ha clonado el ADNc que codifica el ARN DI-C en un plásmido Bluescript II, bajo el control del promotor del fago T7. Este ADNc incluye secuencias políA, una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y las señales de terminación del fago T7. Uno de estos plásmidos, cuya construcción se muestra en la Figura 17 ha sido denominado pDIC-1. Estos plásmidos se pueden manipular para clonar en ellos los genes heterólogos bajo el control del promotor del gen S que está presente en el genoma defectivo, u otro promotor del VGPT, o una variante de estos con eficiencia

aumentada.

El clonaje de los genes heterólogos se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen.

5 A partir de estos ADNc se expresaron ARNs utilizando la polimerasa del fago T7, con los que se transformaron células ST previamente infectadas con el virus colaborador atenuado THER-1, con lo que se rescataron viriones
10 conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo correspondiente. Estos virus, liofilizados en presencia de 2% de suero fetal de ternera se utilizaron como vacuna para la inducción de anticuerpos
15 específicos frente a agentes que infectan el tracto gastrointestinal o respiratorio de cerdos, perros y gatos.

El tropismo de los vectores se hizo específico para las especies porcina, canina o felina utilizando los virus complementadores atenuados adecuados.

EJEMPLO 3

20 Inducción de anticuerpos neutralizantes

3.1 Inducción de protección frente al coronavirus PEDV

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido pDIC-1 en el que se había clonado el gen de
25 la glicoproteína S del coronavirus PEDV.

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10⁹ ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y
30 60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos para el virus PEDV utilizando un radioinmunoensayo (RIA) [Maniatis et al., citado supra].

Con los sueros recogidos a los 45 días después de la
35 inmunización se proporcionó protección completa frente a

la infección por el virus PEDV (estirpe SEG86-1) de lechones de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

5 3.2 Inducción de protección frente al coronavirus canino

Se inmunizaron perros utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (coronavirus canino estirpe Fort Dodge) y el plásmido pDIC-1 en el que se había clonado el gen de la glicoproteína S del coronavirus canino (estirpe Fort Dodge).

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10⁹ ufp por perro por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos frente al coronavirus canino utilizando RIA.

Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el coronavirus canino (estirpe Fort Dodge) de perros de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

25

3.3 Inducción de protección frente a infecciones causadas por el arterivirus PRRSV

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido pDIC-1 en el que se había clonado la ORF3 y la ORF5 del arterivirus PRRSV (estirpe Fort Dodge).

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10⁹ ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y

60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos frente a PRRSV utilizando RIA.

5 Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el PRRSV (estirpe Fort Dodge) de lechones de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

10 **DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**

El plásmido denominado pDIC-1, introducido en una bacteria DH-5 derivada de *E. coli*, [DH5/pDIC-1], ha sido depositado el 6 de Marzo de 1996, en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), en Porton
15 Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG (Reino Unido), correspondiéndole el número de acceso P96030641.

Adicionalmente, el virus complementador atenuado denominado THER-1 ha sido depositado en la ECACC el 6 de Marzo de 1996, correspondiéndole el número de acceso
20 V96030642.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: CYANAMID IBERICA, S.A.
- (B) DIRECCION: CRISTOBAL BORDIU, 35
- (C) CIUDAD: MADRID
- (E) PAIS: ESPAÑA
- (F) CODIGO POSTAL: 28003
- (G) TELEFONO: 34 1 663 91 21
- (H) TELEFAX: 34 1 663 94 01

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS
RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 24

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) MEDIO: Diskete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N° [SEC. ID. N°]: 1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:

GTGAGTGTAG CGTGGCTATA TCTCTTC

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 2:

CCGTTGTGGT GTCACATTAA C

21

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 3:

GCCTCTAGAG GAGCTTTGTG GTTCACTTAC AC

32

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 4:

GCTCTAGAGC GTTTGAATCA ACCCCCAAAA GC

32

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 5:

GGAATTCCGG GACTATCCTA AGTGTG

26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 6:

GGAATTCCAG CAATACTATT ATCAA

25

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 7:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 7:

TTGATAATAG TATTGCTGGC

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 8:

GGACTAGTAT CACTATCAAA AGG

23

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 9:

GATGGATGTT GTGGTGTGAG

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 10:

CGAGTTGGTG TCCGAAGACA AAATCT

26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 11:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 11:

ATACGAGCAT CAATATCACC

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 12:

AGAGTTGCCA CAGACTGCAG

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 13:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 13:
CAGCAGATTC AAAGTTACCC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 14:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 14:
CCATTGTTAA GCCAACAACC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 15:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 15:
ATCACACTTA GGATAGTCCC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 16:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 16:

GTCTAACAAT GTGCCAAGG

19

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 17:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 17:

GCCAGCAATA CTATTATCAA

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 18:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 18:

CACTGTGGCA CCCTTACCTG

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 19:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 19:
GTACACCCAC TATGTTGTCT 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 20:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 20:
TTGCGAGTGA AAACAAATGT 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 21:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 21:
CTCACAATCA GACGCTGTAC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 22:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
 (iii) HIPOTETICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 22:
 GACACGTTGT CCCTGGTTGG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 23:
 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
 (D) TOPOLOGIA: lineal
 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
 (iii) HIPOTETICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 23:
 ACATTTTAAA CAATCACTAG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 24:
 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 9714 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) N° DE CADENAS: bicatenaria
 (D) TOPOLOGIA: circular
 (ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc
 (iii) HIPOTETICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Virus de la gastroenteritis porcina
 transmisible (VGPT)
 (B) ESTIRPE: THER-1
 (C) AISLADO INDIVIDUAL: DI-C
 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 24:

NCCTTTAAAG TAAAGTGAGT GTAGCGTGGC TATATCTCTT CTTTACTTT AACTAGCCTT 60
 GTGCTAGATT TTGTCTTCGG ACACCAACTC GAACTAAACG AAATATTTGT CTTTCTATGA 120
 AATCATAGAG GACAAGCGTT GATTATTTCC ATTCAGTTTG GCAATCACTC CTTGGAACGG 180
 GGTGAGCGA ACGGTGCAGT AGGGTTCCGT CCCTATTTTCG TAAGTCGCCT AGTAGTAGCG 240
 AGTGCGGTTC CGCCCGTACA ACGTTGGGTA GACCGGGTTC CGTCCTGTGA TCTCCCTCGC 300
 CGGCCGCCAG GAGAATGAGT TCCAAACAAT TCAAGATCCT TGTTAATGAG GACTATCAAG 360
 TCAACGTGCC TAGTCTTCCT ATTCGTGACG TGTTACAGGA AATTAAGTAC TGCTACCGTA 420
 ATGGATTGA GGGCTATGTT TTCGTACCAG AATACTGTCTG TGACCTAGTT GATTGCGATC 480
 GTAAGGATCA CTACGTCATT GGTGTTCTTG GTAACGGAGT AAGTGATCTT AAACCTGTTC 540
 TTCTTACCGA ACCCTCCGTC ATGTTGCAAG GCTTTATTGT TAGAGCTAAC TGCAATGGCG 600
 TTCTTGAGGA CTTTGACCTT AAAATTGCTC GCACTGTGAG AGGTGCCATA TATGTTGATC 660
 AATACATGTG TGGTGCTGAT GGAAAACCAG TCATTGAAGG CGATTTTAAG GACTACTTCG 720
 GTGATGAAGA CATCATTGAA TTTGAAGGAG AGGAGTACCA TTGCGCTTGG ACAACTGTGC 780
 GCGATGAGAA ACCGCTGAAT CAGCAAACTC TCTTTACCAT TCAGGAAATC CAATACAATC 840
 TGGACATTCC TCATAAATTG CCAAACCTGTG CTAAGTAGACA TGTAGACCA CCAGTCAAAA 900
 AGAACTCTAA AATAGTTCTG TCTGAAGATT ACAAGAAGCT TTATGATATC TTCGGATCAC 960
 CCTTTATGGG AAATGGTGAC TGTCTTAGCA AATGCTTTGA CACTCTTCAT TTTATCGCTG 1020
 CTAATCTTAG ATGCCCGTGT GGTCTGAAA GTAGCGGCGT TGGAGATTGG ACTGGTTTTA 1080
 AGACTGCCTG TTGTGGTCTT TCTGGCAAAG TTAAGGGTGT CACTTTGGGT GATATTAAGC 1140
 CTGGTGATGC TGTGTCACT AGTATGAGCG CAGGTAAGGG AGTTAAGTTC TTTGCCAATT 1200
 GTGTTCTTCA ATATGCTGGT GATGTTGAAG GTGTCTCCAT CTGGAAAGTT ATTAAGAACTT 1260
 TTACAGTTGA TGAGACTGTA TGCACCCCTG GTTTTGAAGG CGAATTGAAC GACTTCATCA 1320
 AACCTGAGAG CAAATCACTA GTTGCAATGCA GCGTTAAAAG AGCATTTCATT ACTGGTGATA 1380
 TTGATGATGC TGTACATGAT TGTATCATTA CAGGAAAATT GGATCTTAGT ACCAACCTTT 1440
 TTGGTAATGT TGGTCTATTA TTCAAGAAGA CTCCATGGTT TGTACAAAAG TGTGGTGAC 1500
 TTTTGTAGA CGCTTGGAAA GTAGTAGAGG AGCTTTGTGG TTAATCACA CTTACATACA 1560
 AGCAAATTTA TGAAGTTGTA GCATCACTTT GCACTTCTGC TTTTACGATT GTAAACTACA 1620
 AGCCAACATT TGTGGTTCCA GACAATCGTG TTAAGATCT TGTAGACAAG TGTGTGAAAG 1680
 TTCTTGTAAG AGCATTGAT GTTTTACGC AGATTATCAC AATAGCTGGT ATTGAGGCCA 1740
 AATGCTTTGT GCTTGGTCT AAATACCTGT TGTCAATAA TGAATTTGTC AAACCTGTCA 1800
 GTGTTAAAT CCTTGGCAAG AAGCAAAAGG GTCTTGAATG TGCATTCTTT GCTACTAGCT 1860
 TGGTTGGTGC AACTGTTAAT GTGACACCTA AAAGAACAGA GACTGCCACT ATCAGCTTGA 1920
 ACAAGGTGTA TGATGTTGTA GCACCAGGAG AGGGTTATAT CGTCATTGTT GGTGATATGG 1980
 CTTTCTACAA GAGTGGTGAA TATTATTTC TATGCTCTAG TCCTAATTTT GTTCTTACTA 2040
 ACAATGTTTT TAAAGCAGTT AAAGTCCAT CTTATGACAT CGTTTATGAT GTTGATAATG 2100

ATACCAAAAG CAAAATGATT GCAAAACTTG GTTCATCATT TGAACAAATA CCAACTGGCA 2160
 CACAAGATCC AATTCGGTTC TGTATTGAAA ATGAAGTTTG TGTTGTCTGT GGTGTTGGC 2220
 TTAACAATGG TTGCATGTGC GATCGTACTT CTATGCAGAG TTTTACTGTT GATCAAAGTT 2280
 ATTTAAACGA GTGCGGGGTT CTAGTGCAGC TCGACTAGAA CCCTGCAATG GTAGTGATCC 2340
 AGACCATGTT AGTAGAGCTT TTGACATCTA CAACAAAGAT GTTGCCTGTA TTGGTAAATT 2400
 CCTTAAGACG AATTGTTCAA GATTTAGGAA TTTGGACAAA CATGATGCCT ACTACATTGT 2460
 CAAACGTTGT ACAAAGACCG TTATGGACCA TGAGCAAGTC TGTATAACG ATCTTAAAGA 2520
 TTCTGGTGCT GTTGCTGAGC ATGACTTCTT CACATATAAA GAGGGTAGAT GTGAGTTCGG 2580
 TAATGTTGCA CGTAGGAATC TTACAAAGTA CACAATGATG GATCTTTGTT ACGCTATCAG 2640
 AAATTTTGAT GAAAAGAACT GTGAAGTTCT CAAAGAAATA CTCGTGACAG TAGGTGCTTG 2700
 CACTGAAGAA TTCTTTGAAA ATAAAGATTG GTTGATCCA GTTGAAAATG AAGCCATACA 2760
 TGAAGTTTAT GCAAACTTG GACCCATTGT AGCCAATGCT ATGCTTAAAT GTGTTGCTTT 2820
 TTGCGATGCG ATAGTGAAA AAGGCTATAT AGGTGTTATA AACTTGACA ACCAAGATCT 2880
 TAATGGCAAT TTCTACGATT TCGGCGATTT CGTGAAGACT GCTCCGGGTT TTGGTTGCGC 2940
 TTGTGTTACA TCATATTATT CTTATATGAT GCCTTTAATG GGGATGACTT CATGCTTAGA 3000
 GTCTGAAAAC TTTGTGAAA GTGACATCTA TGTTCTGAT TATAAGCAGT ATGATTTACT 3060
 AGCTTATGAT TTACCGAAC ATAAGGAGTA CCTTTTCAA AAATACTTTA AGTACTGGGA 3120
 TCGCACATAT CACCCAAATT GTTCTGATTG TACTAGTGAC GAGTGTATTA TTCATTGTGC 3180
 TAATTTTAAC ACATTGTTTT CTATGACAAAT ACCAATGACA GCTTTTGGAC CACTTGTCGG 3240
 TAAAGTTCAT ATTGATGGTG TACCACTAGT TGTTACTGCA GGTTACCATT TCAAACAACT 3300
 TGGTATAGTA TGAATCTTG ATGTAAATTT AGACACAATG AAGTTGAGCA TGAATGATCT 3360
 TCTTAGATTT GTCACAGATC CAACACTTCT TGTAGCATCA AGCCCTGCAC TTTTAGACCA 3420
 GCGTACTGTC TGTTCTCCA TTGCAGCTTT GAGTACTGGT ATTACATATC AGACAGTAAA 3480
 ACCAGGTCAC TTTAACAAGG ATTTCTACGA TTTCATAACA GAGCGTGGAT TCTTTGAAGA 3540
 GGGATCTGAG TTAACATTAA AACATTTTTT CTTTGACAG GGTGGTGAAG CTGCTATGAC 3600
 AGACTTCAAT TATTATCGCT ACAATAGAGT CACAGTACTT GATATTTGCC AAGCTCAATT 3660
 TGTTTACAAA ATAGTTGGCA AGTATTTGA ATGTTATGAC GGTGGGTGCA TTAATGCTCG 3720
 TGAAGTTGTT GTTACAACT ATGACAAGAG TGCTGGCTAT CCTTTGAACA AATTTGGTAA 3780
 AGCTAGACTT TACTACGAAA CTCTTTCATA TGAAGAGCAG GATGCACCTT TTGCTTTAAC 3840
 AAAGAGAAAT GTTTTACCCA CAATGACTCA AATGAATTTG AAATACGCTA TTTCTGGTAA 3900
 GGCAAGAGCT CGTACAGTAG GAGGAGTTTC ACTTCTTTCT ACCATGACTA GAGACATAA 3960
 TCATCAGAAG CATTGAAGT CAATTGCTGC AACACGCAAT GCTACTGTGG TCATTGGTTC 4020
 AACCAAGTTT TATGGTGGTT GGGACAATAT GCTTAAAAAT TTAATGCGTG ATGTTGATAA 4080
 TGGTTGTTTG ATGGGATGGG ACTATCCTAA GTGTGACCGT GCTTTACCTA ATATGATTAG 4140
 AATGGCTTCT GCCATGATAT TAGGTTCTAA GCATGTTGGT TGTGTACAC ATAATGATAG 4200

GTTCTACCGC CTCTCCAATG AGTTAGCTCA AGTACTCACA GAAGTTGTGC ATTGCACAGG 4260
 TGGTTTTTAT TTTAAACCTG GTGGTACAAC TAGCGGTGAT GGTACTACAG CATATGCTAA 4320
 CTCTGCTTTT AACATCTTTC AAGCTGTTTC TGCTAATGTT AATAAGCTTT TGGGGGTTGA 4380
 TTCAAACGCT TGTACAACG TTACAGTAAA ATCCATACAA CGTAAATTTT ACGATAATTG 4440
 TTATCGTAGT AGCAGCATTG ATGAAGAATT TGTGTGTGAG TACTTTAGTT ATTTGAGAAA 4500
 ACACTTTTCT ATGATGATT TATCTGATGA TGGAGTTGTG TGCTACAACA AAGATTATGC 4560
 GGATTTAGGT TATGTAGCTG ACATTAATGC TTTTAAAGCA ACACTTTATT ACCAGAATAA 4620
 CGTCTTTATG TCCACTTCTA AGTGTGGGT AGAACCAGAT CTTAGTGTG GACCACATGA 4680
 ATTTTGTTC CAGCATACAT TGCAGATTGT TGGGCCTGAT GGAGACTACT ATCTTCCCTA 4740
 TCCAGACCCG TCCAGAATTT TGTCACTGG TGTGTTTGT GATGACATG TTA AACAGA 4800
 CAATGTTATT ATGTTAGAAC GTTACGTGTC ATTGGCTATT GACGCATACC CGCTCACAAA 4860
 ACACCCTAAG CCTGCTTATC AAAAAGTGTT TTACACTCTA CTAGATTGGG TTAACATCT 4920
 ACAGAAAAAT TTGAATGCAG GTGTTCTTGA TTCGTTTTC GTGACAATGT TAGAGGAAGG 4980
 TCAAGATAAG TTCTGGAGTG AAGAGTTTTA CGCTAGCCTC TATGAAAAGT CCACTGTCTT 5040
 GCAAGCTGCA GGCATGTGTG TAGTATGTGG TTCGCAAACT GTACTTCGTT GTGGAGACTG 5100
 TCTTAGGAGA CCACTTTTAT GCACGAAATG TGCTTACGAC CATGTTATGG GAACAAAGCA 5160
 TAAATTCATT ATGCTATCA CACCATATGT GTGTAGTTTT AATGGTTGTA ATGTCAATGA 5220
 TGTTACAAAG TTGTTTTTAG GTGGTCTTAG TTATTATTGT ATGAACCACA AACCACAGTT 5280
 GTCATTCCCA CTCTGTGCTA ATGGCAACGT TTTTGGTCTA TATAAAAGTA GTGCAGTCGG 5340
 CTCAGAGGCT GTTGAAGATT TCAACAACT TGCAGTTTCT GACTGGACTA ATGTAGAAGA 5400
 CTACAAACTT GCTAACAATG TCAAGGAATC TCTGAAAATT TTCGCTGCTG AAACGTGAA 5460
 AGCTAAGGAG GAGTCTGTTA AATCTGAATA TGCTTATGCT GTATTAAAGG AGGTTATCGG 5520
 CCCTAAGGAA ATTGTACTCC AATGGGAAGC TTCTAAGACT AAGCCTCCAC TTAACAGAAA 5580
 TTCAGTTTTC ACGTGTTC AGATAAGTAA GGATACTAAA ATTCAATTAG GTGAATTTGT 5640
 GTTTGAGCAA TCTGAGTAG GTAGTGATTG TGTATTATC AAGAGCACGA GTACTTACAA 5700
 ATTGACACCA GGTATGATT TTGTGTTGAC TTCTCATAAT GTGAGTCCTC TTAAGCTCC 5760
 AATTTTAGTC AACCAAGAAA AGTACAATAC CATATCTAAG CTCTATCCTG TCTTTAATAT 5820
 AGCGGAGGCC TATAATACAC TGGTTCCTTA CTACCAAATG ATAGGTAAGC AAAAATTTAC 5880
 AACTATCCAA GGTCTCCTG GTAGCGGTAA ATCTCATTGT GTTATAGGTT TGGGTTTGTA 5940
 TTACCCTCAG GCGAAGTAG TCTACACTGC ATGTTCTCAT GCGGCTGTAG ACGCTTTATG 6000
 TGA AAAAGCA GCCAAAAT TCAATGTTGA TAGATGTTCA AGGATAATAC CTCAAAGAAT 6060
 CAGAGTTGAT TGTTACACAG GCTTTAAGCC TAATAACACC AATGCGCAGT ACTTGTTTTG 6120
 TACTGTTAAT GCTCTACCAG AAGCAAGTTG TGACATTGTT GTAGTTGATG AGGTCTCTAT 6180
 GTGTACTAAT TATGATCTTA GTGTCATAAA TAGCCGACTG AGTTACAAAC ATATTGTTTA 6240
 TGTGGAGAC CCACAGCAGC TACCAGCTCC TAGAACTTTC ATTAATAAGG GTGTACTTCA 6300

ACCGCAGGAT TACAAATGTTG TAACCAAAAG AATGTGCACA CTAGGACCTG ATGTCTTTTT 6360
 GCATAAATGT TACAGGTGCC CAGCTGAAAT TGTAAAACA GTCTCTGCAC TTGTTTATGA 6420
 AAATAAATTT GTACCTGTCA ACCCAGAATC AAAGCAGTGC TTCAAAATGT TTGTAAAAGG 6480
 TCAGATTGAG ATTGAGTCTA ACTCTTCTAT AAACAACAAG CAACTAGAGG TTGTCAAGGC 6540
 CTTTTTAGCA CATAATCCAA AATGGCGTAA AGCTGTTTTT ATCTCACCTT ATAATAGTCA 6600
 AAATTATGTT GCTCGGCGTC TTCTTGGTTT GCAAAACGCA ACTGTGGATT CCGCTCAGGG 6660
 TAGTGAGTAT GATTACGTCA TCTAGCTGCT CTGAAGATTT TTAATCCTGC TGCAATTCAC 6720
 GATGTGGGTA ATCCAAAAGG CATCCGTTGT GCTACAACAC CAATACCATG GTTTTGTAT 6780
 GATCGTGATC CTATTAATAA CAATGTTAGA TGTCTGGATT ATGACTATAT GGTACATGGT 6840
 CAAATGAATG GTCTTATGTT ATTTTGGAACT TGTAATGTAG ACATGTACCC AGAGTTTTCA 6900
 ATGTTTTGTA GATTGATAC TCGCACTCGC TCTAAATGT CTTTAGAAGG TTGTAATGGT 6960
 GGTGCATTGT ATGTTAATAA CCATGCTTTC CACACACCAG CTTATGATAG AAGAGCTTTT 7020
 GCTAAGCTTA AACCTATGCC ATTCTTTTAC TATGATGATA GTAATTGTGA ACTTGTGAT 7080
 GGGCAACCTA ATTATGTACC ACTTAAGTCA AATGTTTGCA TAACAAAATG CAACATTGGT 7140
 GGTGCTGTCT GCAAGAAGCA TGCTGCTCTT TACAGAGCGT ATGTTGAGGA TTACAACATT 7200
 TTTATGCAGG CTGGTTTTAC AATATGGTGT CCTCAAACTT TTGACACCTA TATGCTTTGG 7260
 CATGGTTTTG TTAATAGCAA AGCACTTCAG AGTCTAGAAA ATGTGGCTTT TAATGTCGTT 7320
 AAGAAAGGTG CCTTCACCGG TTTAAAAGGT GACTTACCAA CTGCTGTTAT TGCTGACAAA 7380
 ATAATGGTAA GAGATGGACC TACTGACAAA TGTATTTTAA CAAATAAGAC TAGTTTACCT 7440
 ACAAATGTAG CTTTTGAGTT ATATGCAAAA CGCAAACTTG GACTCACACC TCCATTAAAC 7500
 ATACTTAGGA ATTTAGGTGT TGTCGCAACA TATAAGTTTG TGTGTGGGA TTATGAAGCT 7560
 GAACGTCCTT TCTCAATTT CACTAAGCAA GTGTGTTTCT AACTGATCT TGATAGTGAA 7620
 GTTGTAACAT GTTTTGATAA TAGTATTGCT GGCTCTTTTG AGCGTTTTTAC TACTACAAGA 7680
 GATGCAGTGC TTATTTCTAA TAACGCTGTG AAAGGGCTTA GTGCCATTAA ATTACAATAT 7740
 GGCCTTTTGA ATGATCTACC TGTAAGTACT GTTGGAAATA AACCTGTCAC ATGGTATATC 7800
 TATGTGCGCA AGAATGGTGA GTACGTCGAA CAAATCGATA GTTACTATAC ACAGGGACGT 7860
 ACTTTTGAAA CCTTCAAACC TCGTAGTACA ATGGAAGAAG ATTTTCTTAG TATGGATACT 7920
 AACTCTTCA TCCAAAAGTA TGGTCTTGAG GATTATGGTT TTGAACACGT TGTATTTGGA 7980
 GATGTCTCTA AAATACCAT TGGTGGTATG CATCTTCTTA TATCGCAAGT GCGCCTTGCA 8040
 AAAATGGGTT TGTTCCTCGT TCAAGAATTT ATGAATAATT CTGACAGTAC ACTGAAAAGT 8100
 TGTGTATTA CATATGCTGA TGATCCATCT TCTAAGAATG TGTGCACTTA TATGGACATA 8160
 CTCTGGACG ATTTTGTGAC TATCATTAAG AGCTTAGATC TTAATGTTGT GTCCAAAGTT 8220
 GTGGATGTCA TTGTAGATTG TAAGGCATGG AGATGGATGT TGTGGTGTGA GAATTCACAT 8280
 ATTAACCT TCTATCCACA ACTCCAATCT GCTGAATGGA ATCCCGGCTA TAGCATGCCT 8340
 AACTGTACA AAATCCAGCG TATGTGTCTC GAACGGTGTA ATCTCTACAA TTATGGTGCA 8400

CAAGTGAAAT TACCTGATGG CATTACTACT AATGTCGTTA AGTATACTCA GTTGTGTCAA 8460
 TACCTTAACA CTACTACATT GTGTGTACCA CACAAAATGC GTGTATTGCA TTTAGGAGCT 8520
 GCTGGTGCACT CTGGTGTTGC TCCTGGTAGT ACTGTATTAA GAAGATGGTT ACCAGATGAT 8580
 GCCATATTGG TTGATAATGA TTTGAGAGAT TACGTTTCCG ACGCAGACTT CAGTGTTACA 8640
 GGTGATTGTA CTAGTCTTTA CATCGAAGAC AAGTTTGATT TGCTCGTCTC TGATTTATAT 8700
 GATGGCTCCA CAAATCAAT TGACGGTGAA AACACGTCGA AAGATGGTTT CTTTACTTAT 8760
 ATTAATGGTT TCATTAAAGA GAAACTGTCA CTTGGTGGAT CTGTTGCCAT TAAATCAGC 8820
 GAATTTAGTT GGAATAAAGA TTTATATGAA TTGATTCAAA GATTTGAGTA TTGGACTGTG 8880
 TTTTGTACAA GTGTTAACAC GTCATCATCA GAAGGCTTTC TGATTGGTAT TAACTACTTA 8940
 GGACCATACT GTGACAAAGC AATAGTAGAT GGAATATAA TGCATGCCAA TTATATATTT 9000
 TGGAGAAACT CTACAATTAT GGCTCTATCA CATAACTCAG TCCTAGACAC TCCTAAATTC 9060
 AAGTGTGCTT GTAACAAAGC ACTTATTGTT AATTTAAAAG AAAAAGAATT GAATGAAATG 9120
 GTCATTGGAT TACTAAGGAA GGGTAAGTTG CTCATTAGAA ATAATGGTAA GTTACTAAAC 9180
 TTTGGTAACC ACTTCGTTAA CACACCATGA AAAAATGCTG TATTTATTAC AGTTTAAATC 9240
 TTTACTACTAA TTGGTAGACT CCAATTATTA GAAAGACTAT TACTTAATCA CTCTTCAAT 9300
 CTTAAACTG TCAATGACTT TAATATCTTA TATAGGAGTT TAGCAGAAAC CAGATTACTA 9360
 AAAGTGGTGC TTCGAGTAAT CTTTCTAGTC TTACTAGGAT TTTGCTGCTA CAGATTGTTA 9420
 GTCACATTAA TGTAAGGCAA CCCGATGTCT AAAACTGGTT TTTCCGAGGA ATTACTGGTC 9480
 ATCGCGCTGT CTACTCTTGT ACAGAATGGT AAGCACGTGT AATAGGAGGT ACAAGCAACC 9540
 CTATTGCATA TTAGGAAGTT TAGATTGAT TTGGCAATGC TAGATTTAGT AATTAGAGA 9600
 AGTTTAAAGA TCCGCTACGA CGAGCCAACA ATGGAAGAGC TAACGTCTGG ATCTAGTGAT 9660
 TGTTTAAAT GTAAAATTGT TTGAAAATTT TCCTTTTGAT AGTGATACAA AAAA 9714

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un genoma viral defectivo que comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además delecciones internas, y en el que dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación.
- 10 2. Un genoma según la reivindicación 1, en el que dicho virus parental es un coronavirus.
- 15 3. Un genoma según las reivindicaciones anteriores, que comprende un genoma defectivo de un coronavirus porcino, canino o felino.
- 20 4. Un genoma según la reivindicación 3, que comprende un genoma defectivo del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT).
- 25 5. Un genoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho virus complementador es el virus parental.
- 30 6. Un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno capaz de inducir respuestas inmunes sistémicas y secretoras, que comprende un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 1 a 5, o su correspondiente ADN complementario (ADNc), y al menos, una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.
- 35 7. Un vector según la reivindicación 6, que comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales

codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

5 8. Un sistema recombinante basado en virus defectivos recombinantes que expresan antígenos capaces de inducir inmunidad sistémica y en mucosas, que comprende:

a) un vector de expresión recombinante basado en un
10 genoma viral defectivo según la reivindicación 1, o su correspondiente ADN complementario (ADNc), que contiene, al menos, una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas; y

b) un virus complementador que proporciona las
15 proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

9. Un sistema según la reivindicación 8, en el que
20 dicho vector de expresión comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

10. Un sistema según la reivindicación 8, que
25 comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene una secuencia de ADN distinta que codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

11. Un sistema según cualquiera de las
30 reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho virus complementador es el virus parental del que deriva el genoma viral defectivo.

12. Una vacuna capaz de inducir protección en
35 animales frente a un agente infeccioso, que comprende una cantidad adecuada de un sistema recombinante según

cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 13. Una vacuna según la reivindicación 12, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

10 14. Una vacuna según la reivindicación 12, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

15 15. Una vacuna según la reivindicación 12, en la que dicho sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN distinta que codifica un antígeno
20 distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

25 16. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

30 17. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

35

18. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales
5 contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

19. Una vacuna según las reivindicaciones 16 a 18, en la que dicho patógeno porcino se selecciona de un grupo
10 constituido esencialmente por: *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Parvovirus porcino*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Pasterella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium* sp., *Serpulina hydrosenteriae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la
15 diarrea epidémica porcina (PEDV), coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina
20 o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

20. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos
25 caninos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno canino.

30 21. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno canino.

22. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales
5 contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno canino.

23. Una vacuna según las reivindicaciones 20 a 22, en la que dicho patógeno canino se selecciona de un grupo
10 constituido esencialmente por: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus),
15 virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

24. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende al
20 menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno felino.

25. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de
ADN que codifica un antígeno de un patógeno felino.

30 26. Una vacuna según la reivindicación 12, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un
35 antígeno de un patógeno felino.

27. Una vacuna según las reivindicaciones 24 a 26, en la que dicho patógeno felino se selecciona de un grupo esencialmente constituido por: calicivirus del gato, virus de la inmunodeficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino, rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, Chlamydia psittaci felina y virus de la leucemia felina.

28. Una vacuna según la reivindicación 12, en la que el virus complementador del sistema recombinante comprende un coronavirus.

29. Una vacuna según la reivindicación 28, en la que dicho coronavirus se selecciona del grupo formado por coronavirus porcinos, caninos y felinos.

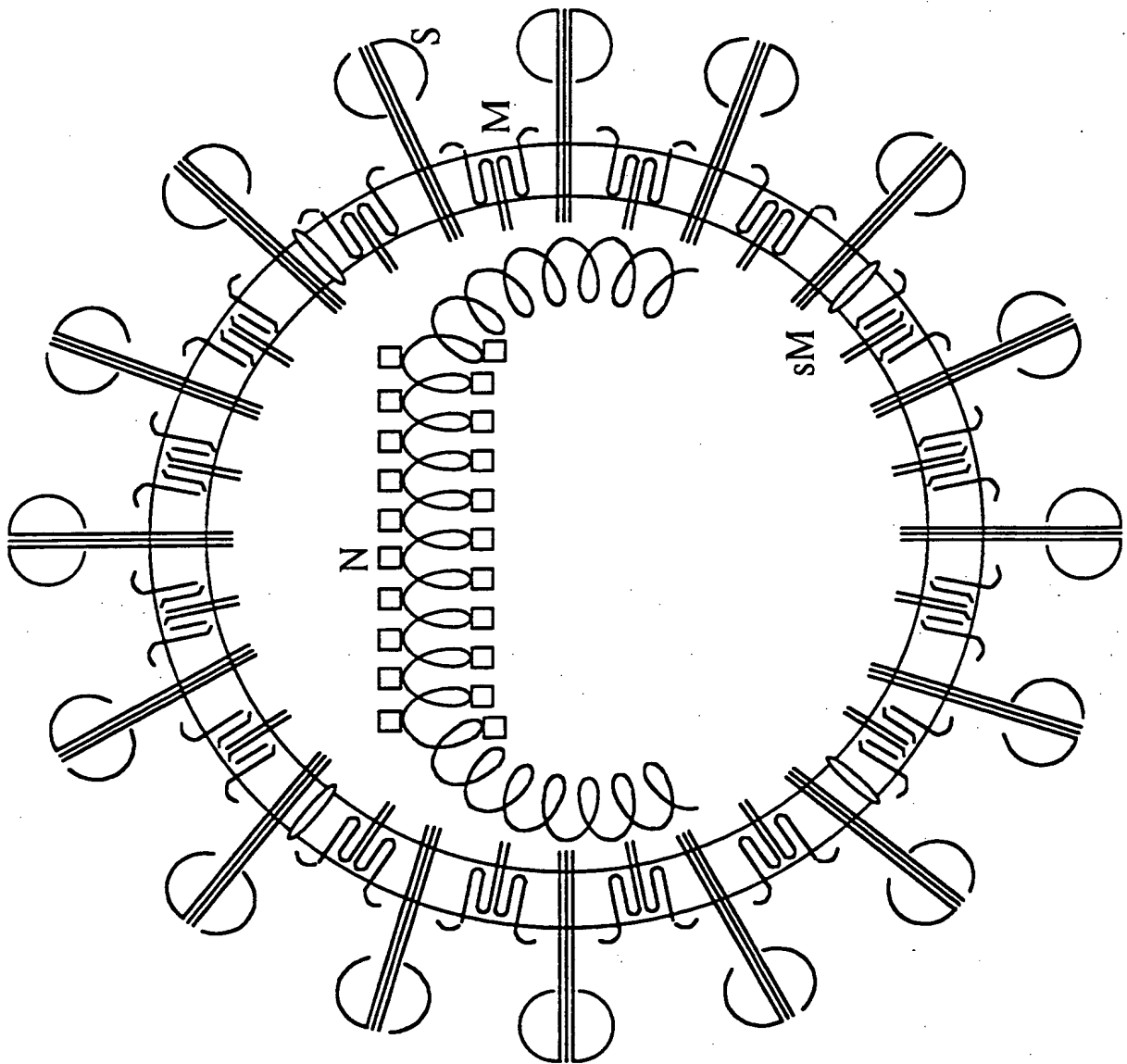


FIGURA 1

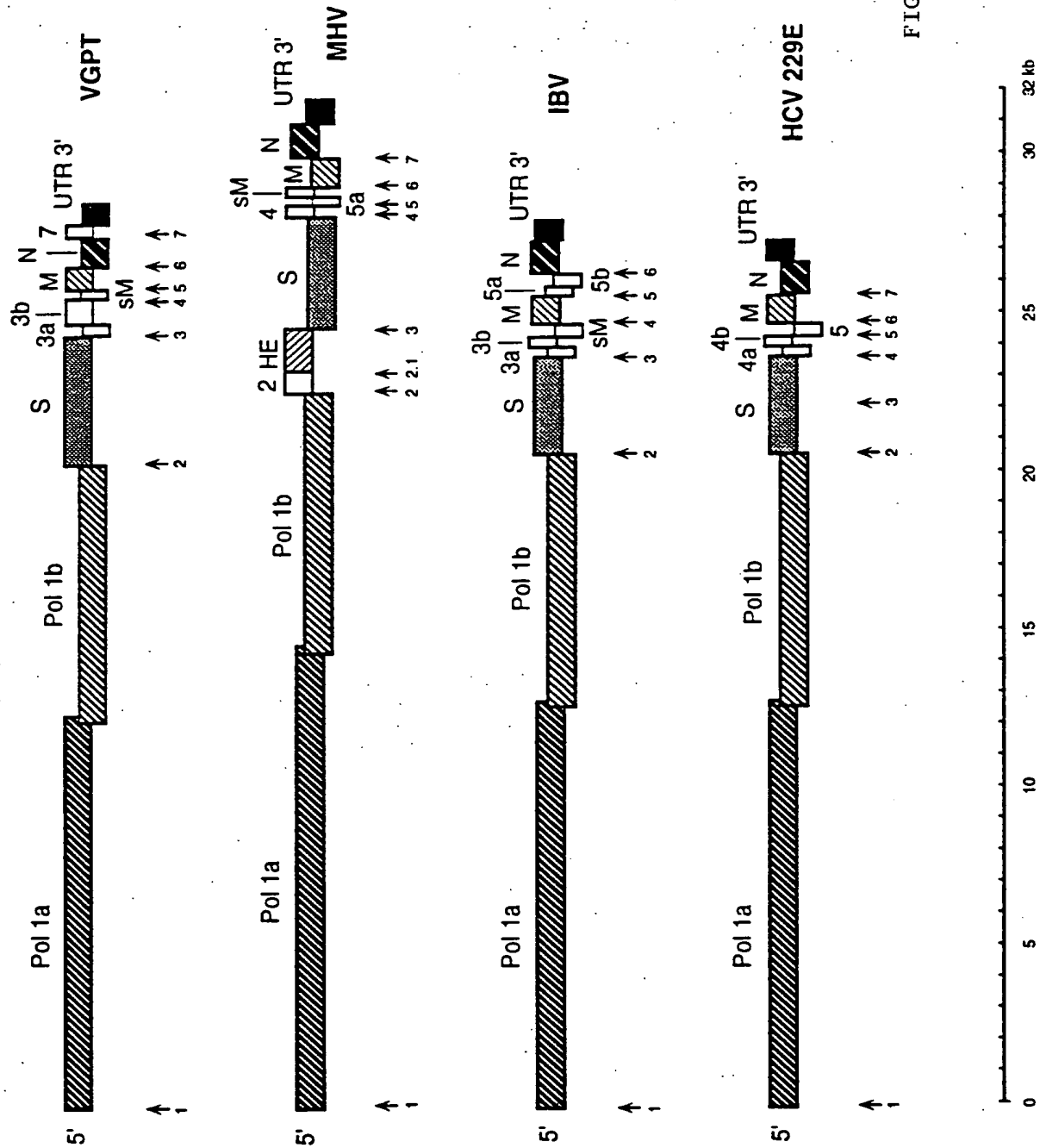


FIGURA 2

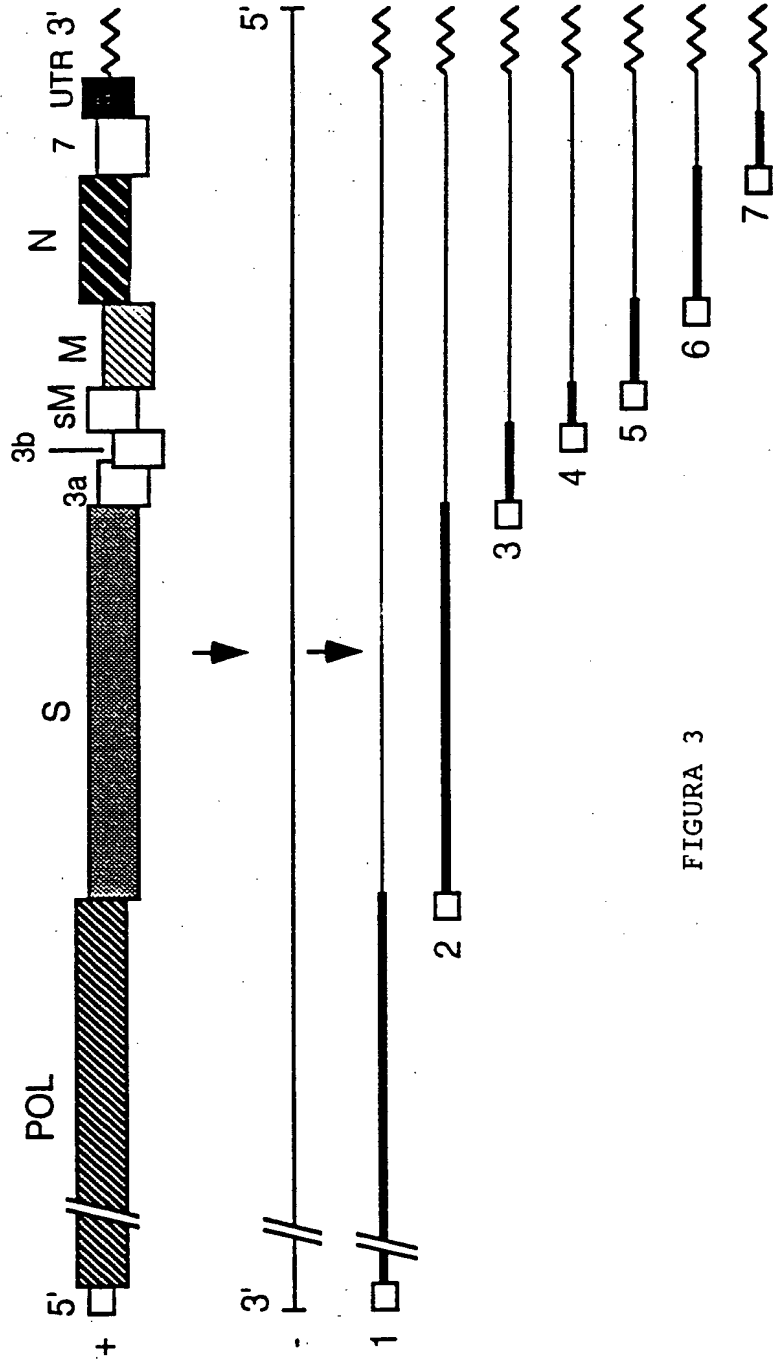


FIGURA 3

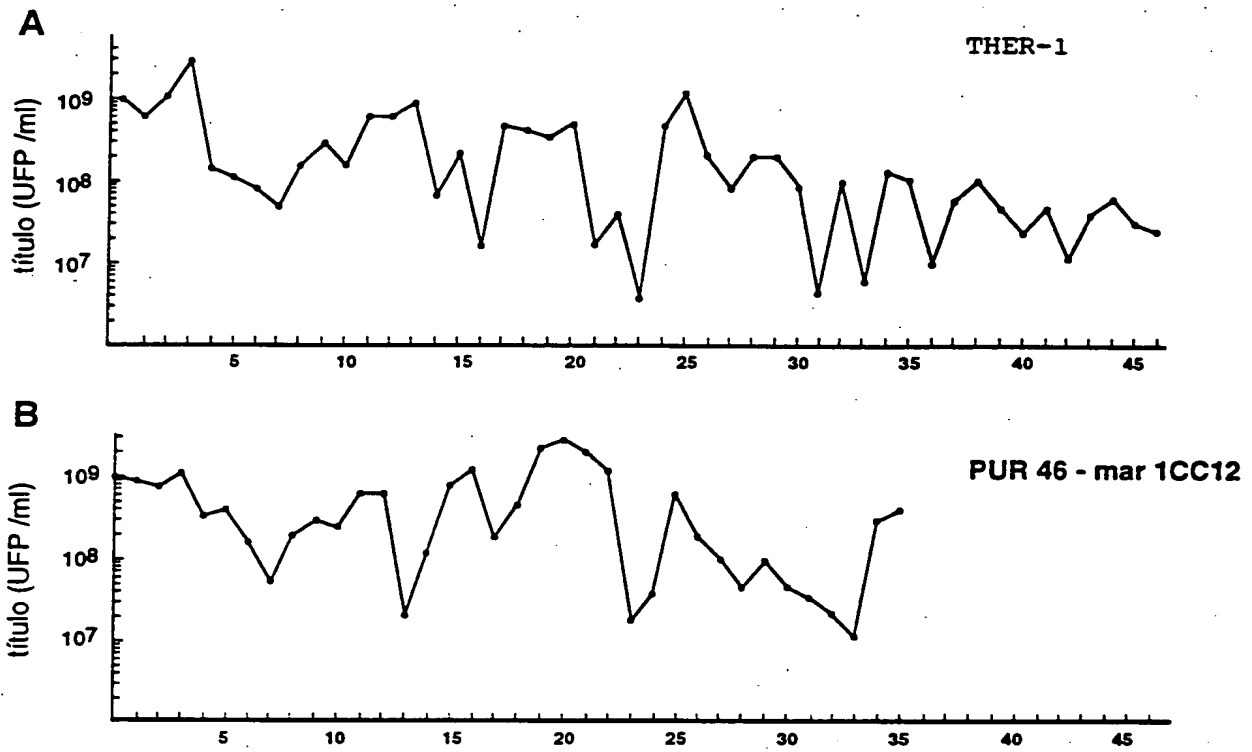


FIGURA 4

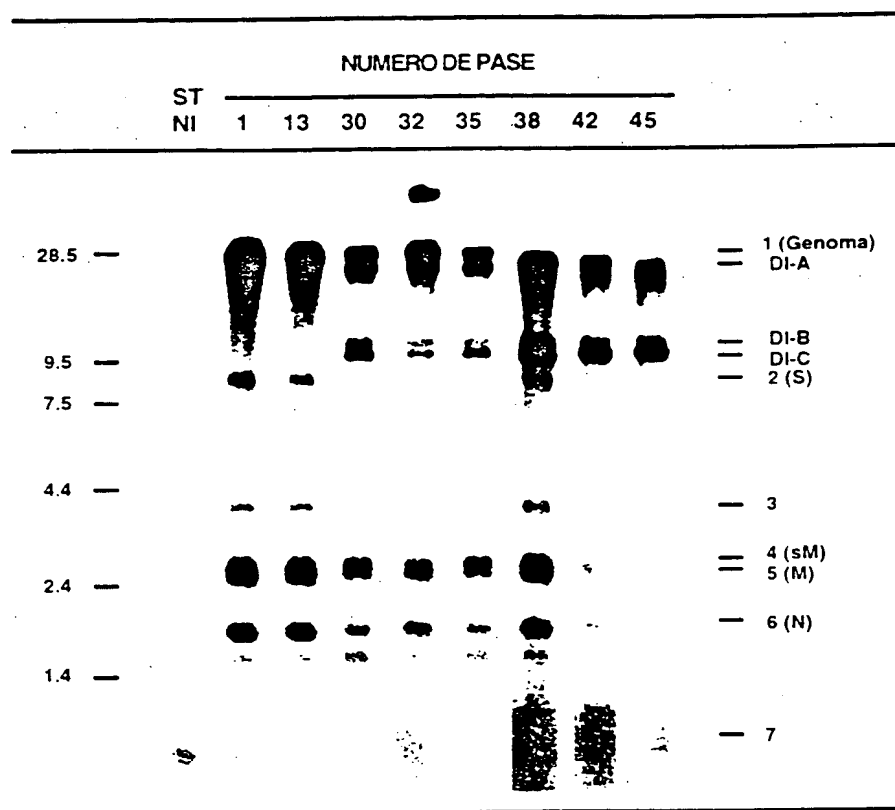


FIGURA 5

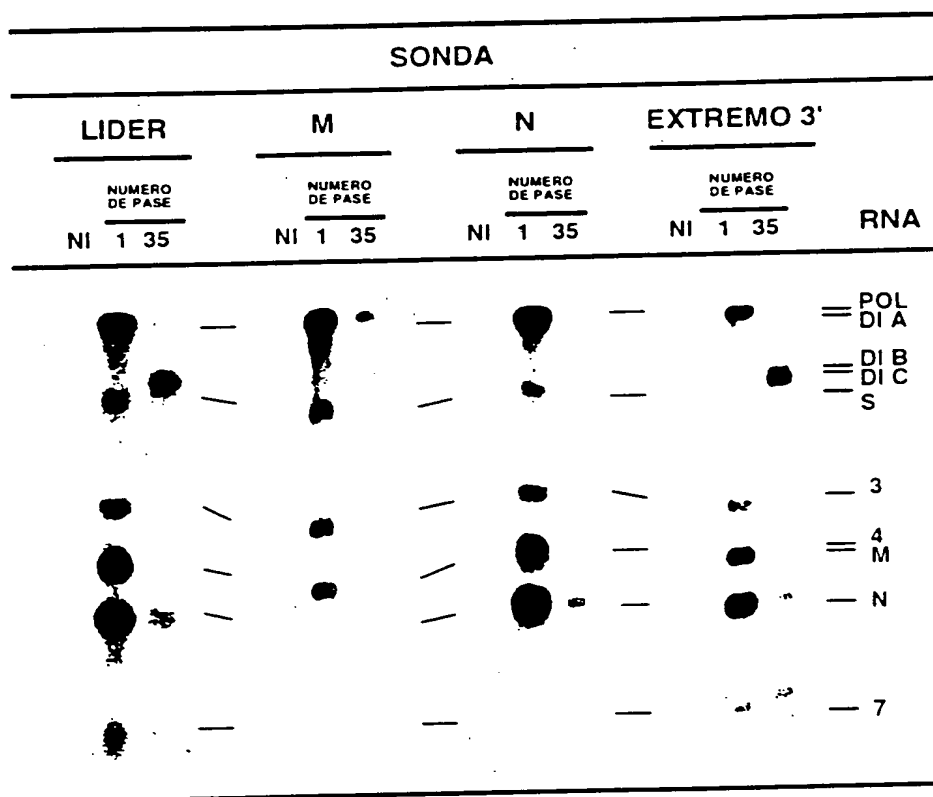


FIGURA 6

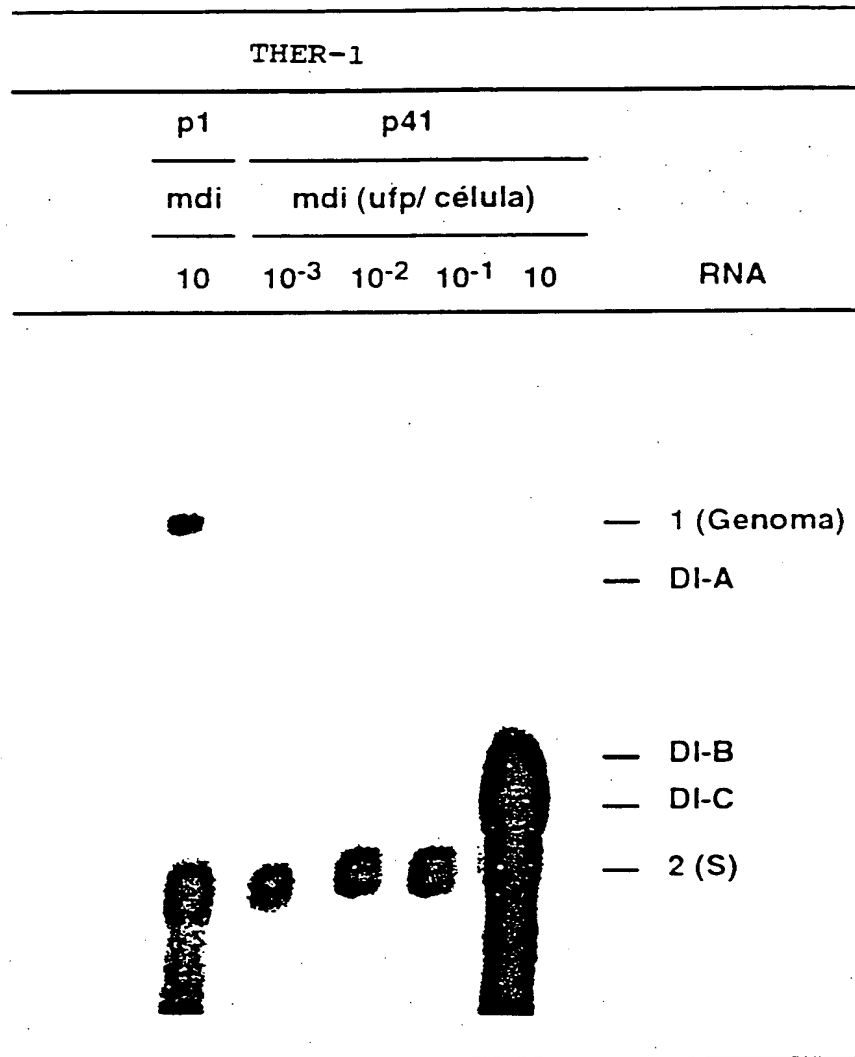
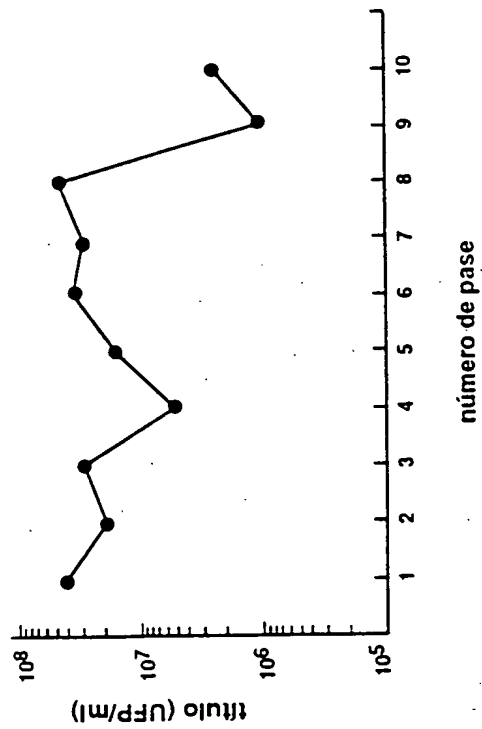


FIGURA 7

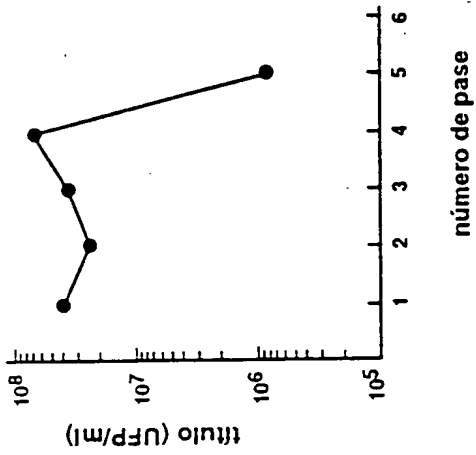
A

CELULAS IPEC



B

CELULAS PM



C

THER-1-STp46

nº de pase en células IPEC			nº de pase en células PM-2		
1	10	RNA	1	5	RNA

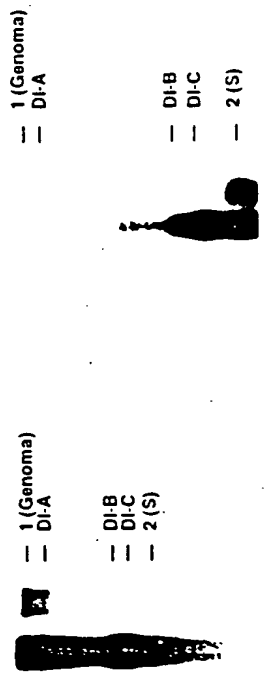


FIGURA 8

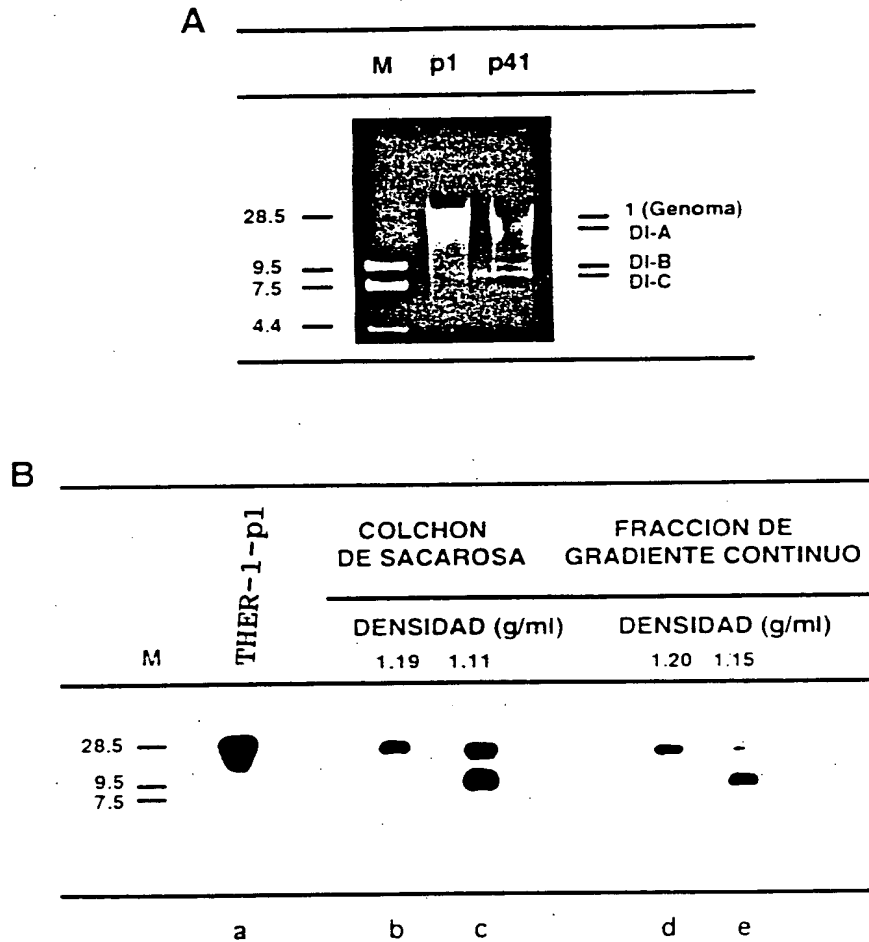


FIGURA 9

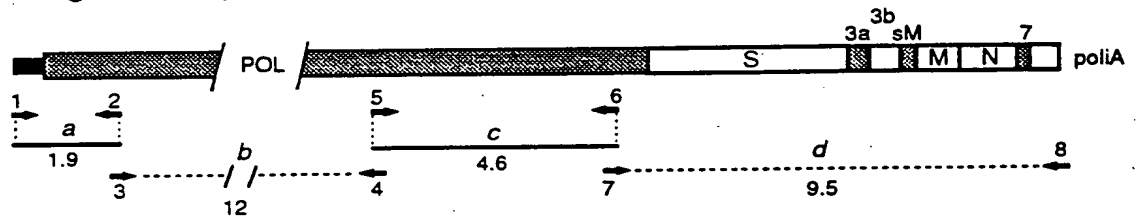
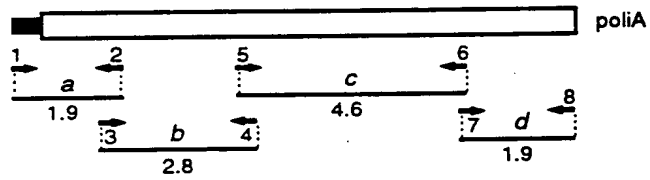
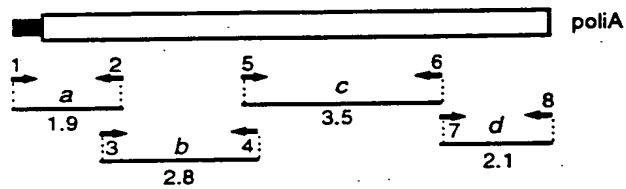
A RNA genómico (28.5 kb)**B** DI-B (-10.6 kb)**C** DI-C (9.7 kb)

FIGURA 10

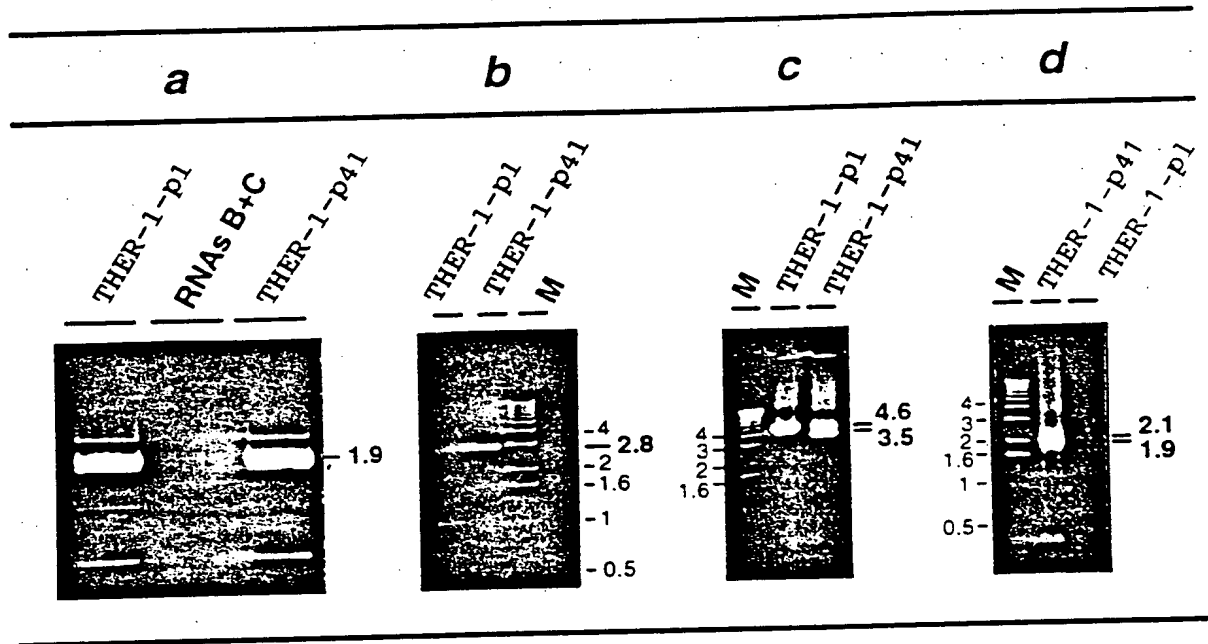


FIGURA 11

NCTTTTAAAGTAAAGTCACTGCTACCGTGGCTATATCTCTCTTTTACTTTAACTACCGTTGCTGCTAGATTTTGTCTTCGGACACCAACTC 90
 GAACATAAACGAAATATTTGTCTTTCTATGAAATCATAGAGGACAAGCGTTGATTATTTCCATTCACTTTGGCAATCACTCCTTGGAAACGG 180
 M K S *
 GGTTCAGCGAACGGTGCAGTAGCGTTCCGTCCCTATTTTCGTAAGTCGCCTAGTAGTAGCGAGTCCGCTTCCGCCCCGTACAACGTTGGGTA 270
 GACCGGGTTCCGTCTGTGATCTCCCTCCCGCGCCGCCAGGAGAATGAGTTCCAAACAATTCAAGATCCTTCTTAATGAGCACTATCAAG 360
 M S S K O F K I L V N E D Y Q
 TCAACGTCCTAGTCTTCTCTATTCTGTGACGTGTTACAGGAAATTAAGTACTGCTACCGTAATGCAATTTGAGCGCTATCTTTTCTACCAG 450
 V N V P S L P I R D V L Q E I K Y C Y R N G F E G Y V F V P
 AATACTGTCTGACCTAGTTGATTGCGATCGTAAGCATCACTACGTCATTGCTGTTCTTGGTAACGGAGTAAGTATCTTAAACCTGTTT 540
 E Y C R D L V D C D R K D H Y V I G V L G N G V S D L K P V
 TTCTTACCGAACCTCCGTGATGTTGCAAGCGCTTTATTGTTAGAGCTAAGTCAATGCGCTTCTTGAGGACTTTGACCTTAAATTTGCTC 630
 L L T E P S V M L Q G F I V R A N C N G V L E D F D L K I A
 GCACTGTCTAGAGGTGCCATATATGTTGATCAATACATGCTGCTGCTGATGCAAAACCAAGTCATTGAAGCGGATTTTAAGCACTACTTCC 720
 R T V R G A I Y V D C Y M C G A D G K P V I E C D F K D Y F
 GTGATGAAGACATCATTGAATTTGAAGGAGAGGAGTACCATTGCGCTTGGACAACCTGTGCGCGATGAGAAACCGCTGAATCAGCAAACTC 810
 G D E D I I E F E G E E Y H C A W T T V R D E K P L N Q Q T
 TCTTTACCATTCAGGAAATCCAATACAATCTCGACATTCTCATAAATTTGCCAAACTGTGCTACTAGACATGTAGCACCACCACTCAAAA 900
 L F T I Q E I Q Y N L D I P H K L P N C A T R H V A P P V K
 AGAACTCTAAATAGTTCTCTCTGAAGATTACAAGAAGCTTTATGATATCTTCGGATCACCTTTATGCGAAATGGTGACTGTCTTAGCA 990
 K N S K I V L S E D Y K K L Y D I F G S P F M G N G D C L S
 AATGCTTTGACACTCTTCATTTTATCGCTGCTACTCTTAGATGCCCGTGTGCTTCTGAAAGTAGCGCGGTTCGACATTGCACTGCTTTTA 1080
 K C F D T L H F I A A T L R C P C G S E S S G V G D W T G F
 AGACTGCTGTGCTGCTTTCTGGCAAAGTTAAGGGTGTCACTTTGCGTGATATTAAGCCTGGTGATGCTGTTGTCACTAGTATGAGCG 1170
 K T A C C G L S G K V K G V T L G D I K P G D A V V T S M S
 CAGGTAAGGGAGTTAAGTTCTTTGCCAATTGTGTTCTTCAATATGCTGCTGATGTTCAAGCTGTCTCCATCTGCAAACTTATTAACCTT 1260
 A G K G V K F F A N C V L Q Y A G D V E G V S I W K V I K T
 TTACAGTTGATGAGACTGTATGCACCCCTGCTTTTGAAGCGCAATTGAACGACTTCATCAAACTGAGAGCAAACTCACTAGTTGCATGCA 1350
 F T V D E T V C T P G F E G E L N D F I K P E S K S L V A C
 GCGTTAAAGAGCATTCACTACTGCTGATATTGATGATGCTGTACATGATTGTATCATTACAGGAAAATTGGATCTTAGTACCAACCTTT 1440
 S V K R A F I T G D I D D A V H D C I I T G K L D L S T N L
 TTGTAATGTTGCTCTATTATTCAAGAAGACTCCATGCTTTGTACAAAAGTGTGCTGCACTTTTTGTAGACCGTTGCAAACTAGTAGAGG 1530
 F G N V G L L F K K T P W F V Q K C G A L F V D A W K V V E
 AGCTTTGTGTTCACTCAGACTTACATACAAGCAAAATTTATGAAGTTGTACCATCACTTTGCACTTCTGCTTTTACGATTGTAACTACA 1620
 E L C G S L T L T Y K Q I Y E V V A S L C T S A F T I V N Y
 AGCCAAACATTTGCTGTTCCAGACAATCGTGTAAAGATCTTGTAGACAAGTGTGTGAAAGTTCTTGTAAAGCATTTCATGTTTTTACCG 1710
 K P T F V V P D N R V K D L V D K C V K V L V K A F D V F T

FIGURA 12/1

AGATTATCACAATAGCTGGTATTGAGCCCAATGCTTTGCTTGGTGGTAAATACCTGTTGTTCAATAATGCCACTTGTCAAACCTTGTCA 1600
 Q I I T I A G I E A K C F V L G A K Y L L F N N A L V A L V
 GTGTTAAATCCTTGGCAAGAAGCAAAAGGGTCTTCAATGTCATTCTTTGCTACTAGCTTGGTGGTGGCAACTGTTAATGTGACACCTA 1890
 S V K I L G K K Q K G L E C A F F A T S L V C A T V N V T P
 AAAGAACAGAGACTGCCACTATCAGCTTGAACAAGGTTGATGATGTTGTAGCACCAGGACAGCGTTATATCGTCATTGTTGGTGATATGG 1980
 K R T E T A T I S L N K V D D V V A P G E G Y I V I V G D M
 CTTTCTACAACAGCTGGTGAATATTATTTTCATGATGCTCTAGCTCTAATTTTCTTCTTACTAACAATGTTTTTAAACCACTTAAAGTTCCAT 2070
 A F Y K S G E Y Y F M M S S P N F V L T N N V F K A V K V P
 CTTATGACATCGTTTATGATGTTGATAATGATACCAAAAGCAAAATGATTGCAAAACTTGGTTCATCTTTGAACAAATACCAACTGGCA 2160
 S Y D I V Y D V D N D T K S K M I A K L G S S F E Q I P T C
 CACAAGATCCAATTCGGTTCTGTATTGAAAATGAAGTTTGTCTGTCTGTGGTGGTTAACAATGCGTTGCATGTCGGATCGTACTT 2250
 T Q D P I R F C I E N E V C V V C G C W L N N G C M C D R T
 CTATCCAGAGTTTTACTGTTGATCAAAGTTATTTAAACGAGTGGGGTCTTACTCCAGCTCCAGTACAGACCTTGAACCTTGAATGCTACTGATCC 2340
 S K L F K R V R G S S A A R L E P C N G T D P
 S M Q S F T V D Q S Y L N E C G V L V Q L D
 AGACCATGTTAGTAGAGCTTTTACATCTACAACAAAGATGTTGGCTGATTGCTAAATTCCTTAAGACCAATTGTTCAACATTACGAA 2430
 D H V S R A F D I Y N K D V A C I G K F L K T N C S R F R N
 TTTGGACAAACATGATGCTACTACATTGTCAAACGTTGTACAAGACCGTTATGGACCATGAGCAAGTCTGTTATAACGATCTTAAAGA 2520
 L D K H D A Y Y I V K R C T K T V M D H E Q V C Y N D L K D
 TTCTGGTGTGTTGCTGAGCATGACTTCTTACATATAAAGAGGCTAGATGTGAGTTCGGTAATGTTGCACGTAGGAATCTTACAAAGTA 2610
 S G A V A E H D F F T Y K E G R C E F G N V A R R N L T K Y
 CACAATGATGGATCTTTGTTACGCTATCAGAAATTTTGCATGAAAAGCACTGTCAAGTTCTCAAAGAAATACTCGTGACAGTACGTTG 2700
 T M M D L C Y A I R N F D E K N C E V L K E I L V T V G A C
 CACTGAAGAATTCTTTGAAAATAAAGATTGGTTTGCATCCAGTTGAAAATGAAGCCATACATGAAGTTTATGCAAACTTGGACCCATTGT 2790
 T E E F F E N K D W F D P V E N E A I H E V Y A K L G P I V
 AGCCAAATGCTATGCTTAAATGCTTGTCTTTTGGCATGGCATAGTGGAAAAGGCTATATAGCTGTTATAACACTTGACAACCAAGATCT 2880
 A N A M L K C V A F C D A I V E K G Y I G V I T L D N G D L
 TAATGGCAATTTCTACGATTTCCGGGATTTCTGGAAGACTGCTCCGGGTTTTGCTTGGCTTGTGTTACATCATATTATTCTTATATGAT 2970
 N G N F Y D F G D F V K T A P G F G C A C Y T S Y Y S Y M H
 GCCTTTAATGGGATGACTTTCATGCTTACAGTCTGAAAACCTTTGCTGAAAAGTGACATCTATGCTTCTGATTATAAGCAGTATGATTACT 3060
 P L M G M T S C L E S E N F V K S D I Y G S D Y K Q Y D L L
 AGCTTATGATTTTACCCAACATAAGGAGTACCTTTTCCAAAATACTTTAAGTACTGGGATGGACATATCAACCAAAATGTTCTGATTG 3150
 A Y D F T E H K E Y L F C K Y F K Y W D R T Y H P N C S D C
 TACTAGTGACGAGTGTATTATTCATTGTGCTAATTTTAAACACATTGTTTCTATGACAATACCAATGACAGCTTTTGGACCACTTGTCCG 3240
 T S D E C I I H C A N F N T L F S M T I P M T A F G P L V R
 TAAAGTTCATATTGATGCTGTACCACTAGTTGTTACTGCGAGTTTACCATTTTCAACAACTTGGTATAGTATGGAATCTTTCATGTAAAT 3330
 K V H I D G V P V V V T A G Y H F K Q L G I V W N L D V K L
 AGACACAATGAAGTTGAGCATGACTGATCTTCTTAGATTTGTCACAGATCCAACACTTCTTGTACCATCAAGCCCTGCACTTTTACACCA 3420
 D T M K L S M T D L L R F V T D P T L L V A S S P A L L D O

FIGURA 12/2

CGCTACTGTCGTTTCTCCATTGCAGCTTTGAGTACTGGTATTACATATCAGACAGTAAACCAGCTCACTTTAACAAGGATTTCTACCA 3510
 R T V C F S I A A L S T G I T Y C T V K P G H F N K C F Y C

TTTTCATAACAGAGCGTGCATTCTTTCAAGAGCGATCTGAGTTAACATTAACATTTTCTTTCCACAGCGTGGTGAAGCTGCTATGAC 3600
 F I T E R C F F E E G S E L T L K H F F F A Q G C E A A M

AGACTTCAATTATTATCGCTACAATAGAGTCACAGTACTTCATATTTGCCAAGCTCAATTTGTTTACAAAATAGTTCCGAAGTATTTGA 3690
 D F N Y Y R Y N R V T V L D I C Q A O F V Y K I V G K Y F E

ATGTTATGACCGTGGCTGCATTAATGCTCGTGAAGTTGTTGTTACAACTATGACAAGAGTGGTGGCTATCCTTTGAACAAATTTGCTAA 3780
 C Y D G G C I N A R E V V V T N Y D K S A G Y P L N K F G K

AGCTAGACTTTACTACGAAACTCTTTCATATGAAGAGCAGGATGCACCTTTTCTTTAACAAGAGAAATGTTTACCCACAATGACTCA 3870
 A R L Y Y E T L S Y E E Q D A L F A L T K R N V L P T M T Q

AATGAATTTCAAAATACGCTATTTCTGGTAAGGCAAGAGCTCGTACAGTAGGAGGAGTTTCACTTCTTTTACCATGACTACGAGACAATA 3960
 M N E K Y A I S C K A R A R T V G G C Y S L L S T M T T R O Y

TCATCAGAAGCATTGGAAGTCAATTGCTGCAACAGCAATGCTACTGTGCTCATTGGTTCAACCAAGTTTATCGTGGTGGGACAATAT 4050
 H Q K H L K S I A A T R N A T V V I G S T K F Y G G W D N M

GCTTAAAAATTTAATCGCTGATGTTGATAATGCTTGTGTTGATGGGATGGCACTATCCTAAGTGTGACCGTGGCTTTACCTAATATGATTAG 4140
 L K N L H R O V D N G C C L M G W D Y P K C D R A L P N M I R

AATGGCTTCTGCCATGATATTAGGTTCTAAGCATGTTGGTGTGTTGACACATAATGATAGGTTCTACCGCTCTCCAATGAGTTAGCTCA 4230
 H A S A M I L G S K H V G C C T H N D R F Y R L S N E L A D

AGTACTCAGAGAAGTTGTCATTGCACAGGTGGTTTTATTTTAAACCTGGTGTACAACAGCGGTGATGGTACTACAGCATATGCTAA 4320
 V L T E V V H C T G G F Y F K P G C T T S G O G T T A Y A N

CTCTGCTTTTAAACATCTTTCAAGCTGTTTCTGCTAATGTTAATAAGCTTTTGGGGTTGATTCAAACGCTTGAACAACGTTACAGTAAA 4410
 S A F N I F O A V S A N V N K L L G V D S N A C N N V T V K

ATCCATACAACGTAAATTTACGATAATTGTTATCGTACTAGCAGCATTGATCAAGAATTTGTTGTTGAGTACTTTAGTTATTTGAGAAA 4500
 S I O R K I Y D N C Y P S S S I D E E F V V E Y F S Y L R K

ACACCTTTCTATGATGATTTTATCTGATGATGGAGTTGTTGCTACAACAAAGATTATGCCGATTAGGTTATGTAGCTGACATTAATGC 4590
 H F S M M I L S D D G V Y C Y N K D Y A D L G Y V A D I N A

POLIMERASA

TTTTAAAGCAACACTTTATTACCAGAATAACGCTTTTATGTCACCTTCTAAGTGTGGGTAGAACCAGATCTTAGTGTGACCACATGA 4680
 F K A T L Y Y Q N N V F M S T S K C W V E P D L S V G P H E

ATTTTGTTCACAGCATACATTGCAGATTGTTGGGCTGATGGAGACTACTATCTCCCTATCCAGACCCGTCAGAAATTTGCTCAGCTGG 4770
 F C S Q H T L Q I V G P D G D Y Y L P Y P D P S R I L S A G

TGTGTTTGTGATGACATAGTTAAACACAGCAATGTTATTATGTTAGAAGCTTACGTTGCTATTGGCTATTGACGCATACCCGCTCAGAAA 4860
 V F V D D I V K T D N V I M L E R Y V S L A I D A Y P L T K

ACACCCCTAAGCCTGCTTATCAAAAAGTGTTTTACACTCTACTAGATTGGGTTAAACATCTACAGAAAAATTTGAATGCAGGCTGTTCTGA 4950
 H P K P A Y Q K V F Y T L L Q W V K H L Q K N L N A G V L D

TTGCTTTTCACTGACAATGTTAGAGGAAGCTCAAGATAAGTTTGGAGTCAAGAGTTTACGCTAGCCTCTATGAAAAGTCCACTGCTTT 5040
 S F S V T M L E E G Q D K F W S E E F Y A S L Y E K S T V L

GCAAGCTGCAGGCATGCTGTAGTATGCTGTTCCGAACTGTAAGTGTGGAGACTGTCTTAGCAGACCACTTTTATGCCAGGAAATG 5130
 Q A A G H C V V C G S Q T V L R C G D C L R R P L L C T K C

PEDOS DE ZINC

FIGURA 12/3

TGCTTACGACCATGTTATGGGAACAAAGCATAAATTCATTATGCTCTATCACACCATATGCTGTAGTCTTTAATGGTTGTAATGCTCAATGA 5220
 A Y D H V M G T K H K F I M S I T P Y V C S F N G C N V N G
 DEDOS DE ZINC
 TGTACAAAGTTGTTTTAGTGGTCTTACTTATTATTGTATGAACCACAAACCACAGTTGCTATTCCCACTCTGTGCTAATGCCAAGT 5310
 V T K L F L G G L S Y Y C M N H K P Q L S F P L C A N G N V
 TTTTGGTCTATATAAAGTAGTGCAGTCGGCTCAGAGGCTGTTGAAGATTTCAACAACTTGCAGTTTCTGACTGGACTAATGTAGAAGA 5400
 F G L Y K S S A V G S E A V E D F N K L A V S D W T N V E D
 CTACAAACTTGCTAACAATGTCAAGGAATCTCTGAAAATTTTCGCTGCTGAAACTGTGAAAGCTAAGCAGGAGTCTGTTAAATCTGAATA 5490
 Y K L A N N V K E S L K I F A A E T V K A K E E S V K S E Y
 TGCTTATGCTGTATTAAAGCAGGTTATCGGCCCTAAGCAAATTTGACTCCAATGGGAAGCTTCTAAGACTAAGCCTCCACTTAACAGAAA 5580
 A Y A V L K E V I G P K E I V L Q W E A S K T K P P L N R N
 TTCAGTTTTACGCTGTTTTAGATAAGTAAGGATACTAAAATTCATAGCTGAATTTGTTTACCAATCTGACTACGCTAGTGATTC 5670
 S V F T C F Q I S K D T K I Q L G E F V F E Q S E Y G S D S
 TGTTTATTACAAGCAGCAGTACTTACAAATTCACACCAAGGTATGATTTTTGCTTGACTTCTCATAATGTGAGTCTCTTAAAGCTCC 5760
 V Y Y K S T S T Y K L T P G M I F V L T S H N V S P L K A P
 AATTTTACTCAACCAAGCAAAAGTACAATACCATATCTAAGCTCTATCCTGCTCTTAATATAGCGGAGGCTTATAATACACTGGTTCCTA 5850
 I L V N Q E K Y N T I S K L Y P V F N I A E A Y N I L Y P Y
 CTACCAATGATAGGTAAGCAAAATTTACAACCTATCAAGGCTCTCTGCTAGCGGCTAAATCTCATTGCTTATAGGTTTGGGTTTGA 5940
 Y Q M I G K Q K F T T I O G P P G S G K S H C V I G L G L Y
 HELICASA
 TTACCCTCAGCGCAGAATAGTCTACACTGCATGTTCTCATCGCGCTGTAGACGCTTTATGTGAAAAAGCAGCCAAAACTCAATGTTGA 6030
 Y P Q A R I V Y T A C S H A A V D A L C E K A A K N F N V D
 TAGATGTTCAAGGATAATACCTCAAAGAATCAGAGTTGATTGTTACACAGGCTTTAAGCCTAATAACCAATCGCGAGTACTTGTGTTG 6120
 R C S R I I P Q R I R V D C Y T G F K F N N T N A O Y L F C
 TACTGTTAATGCTCTACCAGAAGCAAGTTGTGACATTGTTGAGTTGATGAGGCTCTCTATGTGTACTAATTATGATCTTACTGTCTATAA 6210
 T V N A L P E A S C D I V V V D E V S H C T N Y D L S V I N
 TAGCCGACTGAGTTACAAACATATGTTTATGTTGGAGACCCACAGCAGCTACCAGCTCTAGAACTTTGATTAATAAGCGTGTACTTCA 6300
 S R L S Y K H I V Y V G D P Q Q L P A P R T L I N K G V L Q
 ACCGCAGGATTACAATGTTGTAACCAAAAGAATGTGCACACTAGCAGCTGATGCTTTTTGCATAAATGTTACAGTCCCCAGCTGAAAT 6390
 P Q D Y N V V T K R M C T L G P D V F L H K C Y R C P A E I
 TGTTAAACAGTCTCTGCACTGTTTATGAAAATAAATTTGTACCTGTCAACCCAGAATCAAAGCAGTCTTCAAAATGTTTGTAAAAG 6480
 V K T V S A L V Y E N K F V P V N P E S K Q C F K M F V K G
 TCAGATTGAGTTGAGTCTAACTCTTCTATAAACAAGCAACTAGAGGTTGCTCAAGGCTTTTTAGCACATAATCCAAATGCCGTAA 6570
 Q I Q I E S N S S I N N K O L E V V K A F L A H N P K W R K
 AGCTGTTTTCTCTCACCCTATAATAGTCAAAATGTTGCTCGCGCTCTTCTGCTTTGCAAACGCAAACTGTGGATTCCGCTCAGCG 6660
 A V F I S P Y N S O N Y V A R R L L G L Q T C T V D S A O G
 TAGTGAGTATGATTACGTCATCTAGCTGCTCTGAAGATTTTAACTCTGCTGCAATTCAGGATGTGGGTAATCCAAAAGGCATCCGTTGT 6750
 S E Y D Y V I
 II ← I → III
 GCTACAACACCAATACCATGTTTTGTTATGATCGTGATCCTATTAAATAACAATGTTAGATGCTGCGATTATGACTATATCGTACATGCT 6840

FIGURA 12/4

CAAATGAATGCTCTTATGTTATTTGGAACTGTAAATGTAGACATGTACCCAGAGTTTTCAATTGTTTGTAGATTGGATCTCCACTCGC 6930
 TCTAAATTTGCTTTTAGAAGGTTGTAAATGCTGTCATTTGTATGTTAATAACCATGCTTTCCACACACCAGCTTATGATAGAAGAGCTTTT 7020
 GCTAAGCTTAAACCTATGCCATTTCTTTACTATGATGATAGTAAATTTGTGAAGTTGTTGATGGCAACCTAATTTATGTACCACCTTAACTCA 7110
 AATGTTTGCATAACAAAAATGCAAGCTTGGTGGTGGTGTCTGCAAGAAGCATGCTGCTCTTTACAGAGCGTATGTTGAGGATTACAACATT 7200
 TTTATGCCAGGCTGCTTTTACAATATGGTGTCTGCTCAAAACTTTGACACCTATATGCTTTGGCATGCTTTTGTAAATAGCAAAAGCACTTCAG 7290
 AGTCTAGAAAAATGTGGCTTTTAAATGCTGTTAAGAAAGGTGCCCTTCACCGGTTTTAAAAGGTGACTTACCAACTGCTGTTATTTGCTGACAAA 7380
 ATAATGTTAAGAGATGGACCTACTGACAAATGTATTTTACAAATAAGACTAGTTTACCTACAAATGTAGCTTTTGAGTTATATGCAAAA 7470
 CGCAAACTTGGACTCACACCTCCATTAACTACTTACGAATTTAGGTGTTGCTGCCAACATATAAGTTTGTGTTGCTGGGATTATGAAGCT 7560
 GAACGCTCTTTCTCAAAATTCAGTAAGCAAGTGTCTTCTACACTGATCTTGATAGTGAAGTTGTAACATGTTTTGATAATAGTATTGCT 7650
 GGCTCTTTTGGAGCTTTTACTACTACAAGAGATGCAGTCTTATTTCTAATAACGCTGTGAAAGCGCTTAGTGCCATTAAATTACAATAT 7740
 GGCTTTTTGAATGATCTACCTGTAAAGTACTGTTGCAAAATAAACCTGTGCATGCTATATCTATGTGCGCAAGAATGCTGAGTACGTCGAA 7830
 CAAATCGATAGTTACTATACACAGGAGCTACTTTTCAAACTTCAAACTCGTAGTACAATGCAAGAAGATTTTCTTACTATGGTACT 7920
 ACACCTCTTCATCCAAAAGTATGCTCTTGAGGATTATGCTTTTGAACAGCTTGATTTGGAGATGTCTCTAAAACCTACCATTGCTGCTATG 8010
 CATCTCTTATATCGCAAGTGGCGCTTGGCAAAATGGCTTTGCTTTCCGTTCAAGAATTTATGAATAATTTCTGACAGTACACTGAAAAGT 8100
 TGTGTATTACATATGCTGATGATCCATCTCTAAGAATGTGTGCACTTATATGGACATACTCTTGGACGATTTTGTGACTATCATTAAAG 8190
 AGCTTAGATCTTAATGTTGTTGTTCAAAAGTGTGGATGTCATTTGATAGTTGTAAGGCATGGAGATGGATGTTGTTGGTGTGACAATTCACAT 8280
 ATTAACCTTCTTATCCCAACTCCAAATCTGCTGAATGGAATCCCGCTATAGCATGCTTACACTGTACAAAATCCAGCGTATGTGTCTC 8370
 GAACGGTGTAACTCTCTACAATATGGTGGCAAGTGAATTAACCTGATGGCATTACTACTAATGTCTTAACTATACTCACTTGTGTCAA 8460
 TACCTTAACACTACTACATTTGTGTGTACCACACAAAAATGCGTGTATTTGCATTTAGGAGCTGCTGCTGCAATCTGGTGTCTCTCTGCTAGT 8550
 ACTGTATTAAGAAGATGGTTACAGATGATGCCATATTGGTTGATAATGATTTGAGAGATTACCTTTCCGACCGAGACTTCAGTGTTACA 8640
 GGTGATTGTACTAGTCTTTACATCGAAGACAAAGTTTGATTTGCTGCTCTCTGATTTATATGATGGCTCCACAAAATCAATTCACGGTGAA 8730
 AACACGTCGAAAGATGCTTTCTTTACTTATATTAATGCTTTTATTAAAGAGAACTGTCACTTGGTGGATCTCTTCCATTAAATCACC 8820
 GAATTTAGTTGCAATAAGATTTATATGAATGATTCAAGATTTGAGTATTGGACTGTGTTTTGTACAAGTGTAAACAGCTCATCATCA 8910
 GAAGGCTTTCTGATTGGTATTAATCTACTTAGGACCATACTGTGACAAAGCAATAGTAGATGGAATATAATGCATGCCAATTATATATT 9000
 TGGAGAACTCTACAATTATGGCTCTATACATAAATCAGTCTAGACACTCTAAATTCAGTGTGCTTGTAAACAGCCACTTATGTT 9090
 AATTTAAAGAAAAAAGAAATGAATGAATGGTCAATGCTTGGATTACTAAGGAAGGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGGTAACTTACTAAAC 9180
 TTTGGTAACCACTTCGTTAACACACCTTTTAAAAATGCTGTATTTATTACAGTTTAACTCTTACTACTAATGGTAGACTCCAATTATTA 9270

III IV
 ← →
 P K K C C I Y Y S F N L T T N W .

GAAAGACTATTACTTAAATCACTCTTTCAATCTTAAACTGTCAATGACTTTAATATCTTATATAGGAGTTTAGCAGAAACCAGATTACTA 9360
 AAAGTGGTGTCTTCAGTAATCTTTCTAGCTTACTAGGATTTTGTGCTACAGATTGTTAGTCACATTAATGTAAGGCAACCCGATGCT 9450
 AAAACTGGTTTTTCCGAGGAATTACTGGTCACTGGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCAGCTGTAATAGGAGGTACAAGCAACC 9540
 CTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTASTAATTTAGACAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACA 9630
 ATGGAAGAGCTAACGCTGGATCTAGTGTATTTTAAATGTAAATTTGTTTGAATAATTTTCTTTTGTAGTGTACAAAAA 9714

FIGURA 12/5

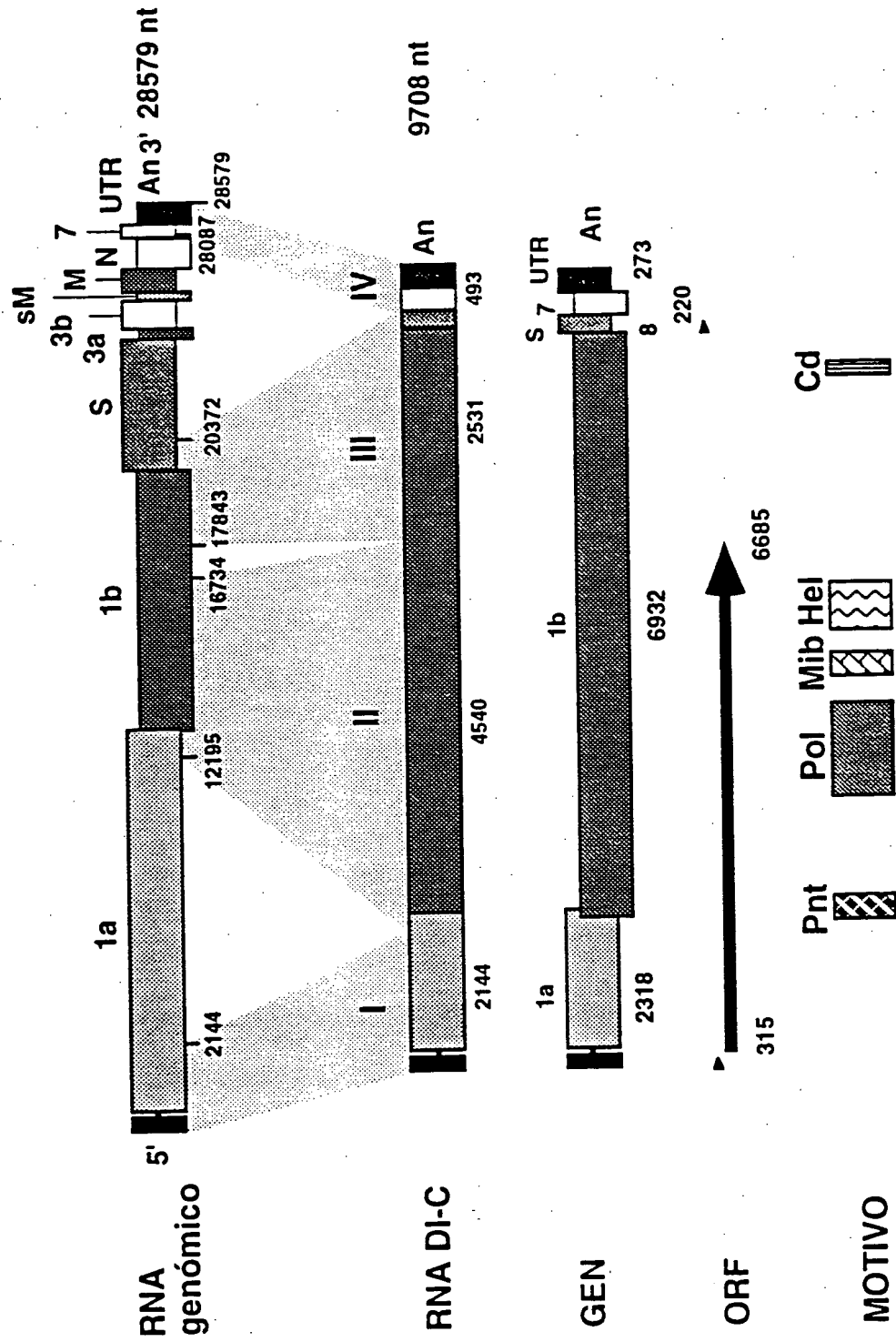


FIGURA 13

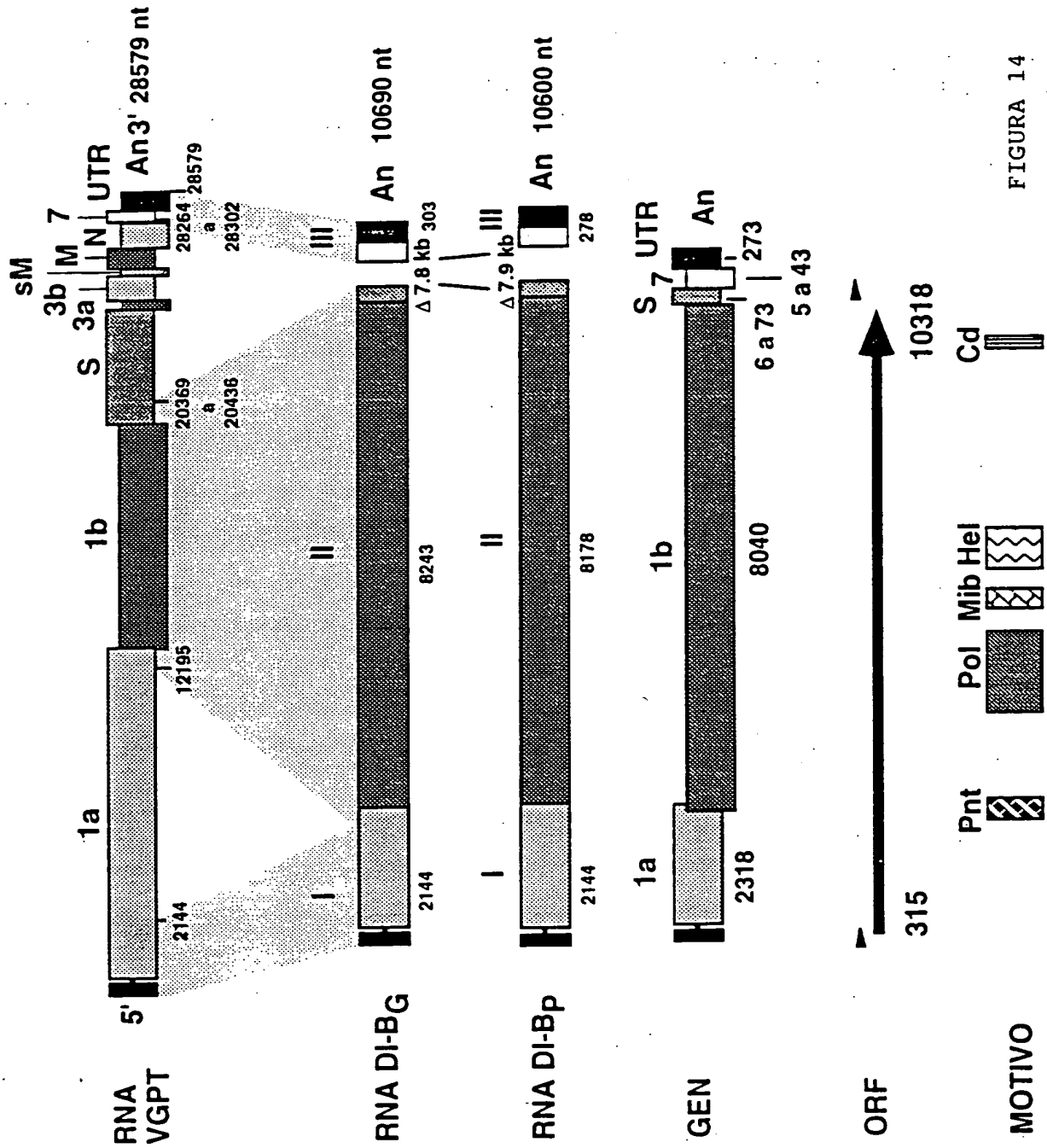


FIGURA 14

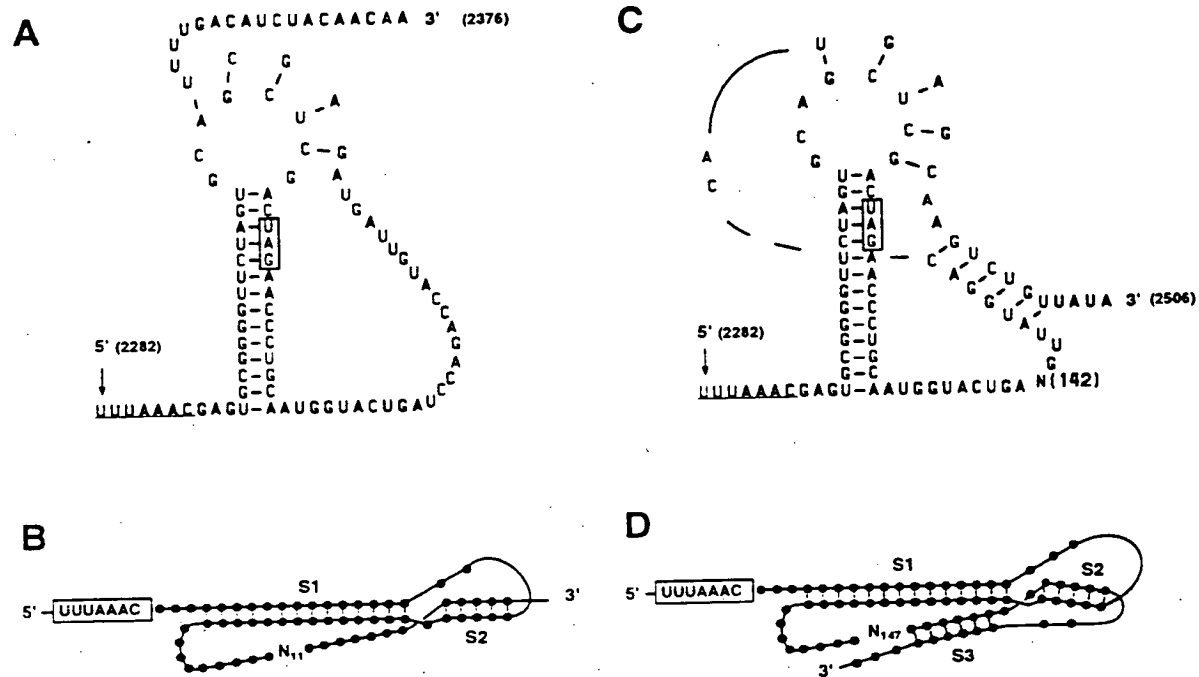


FIGURA 15

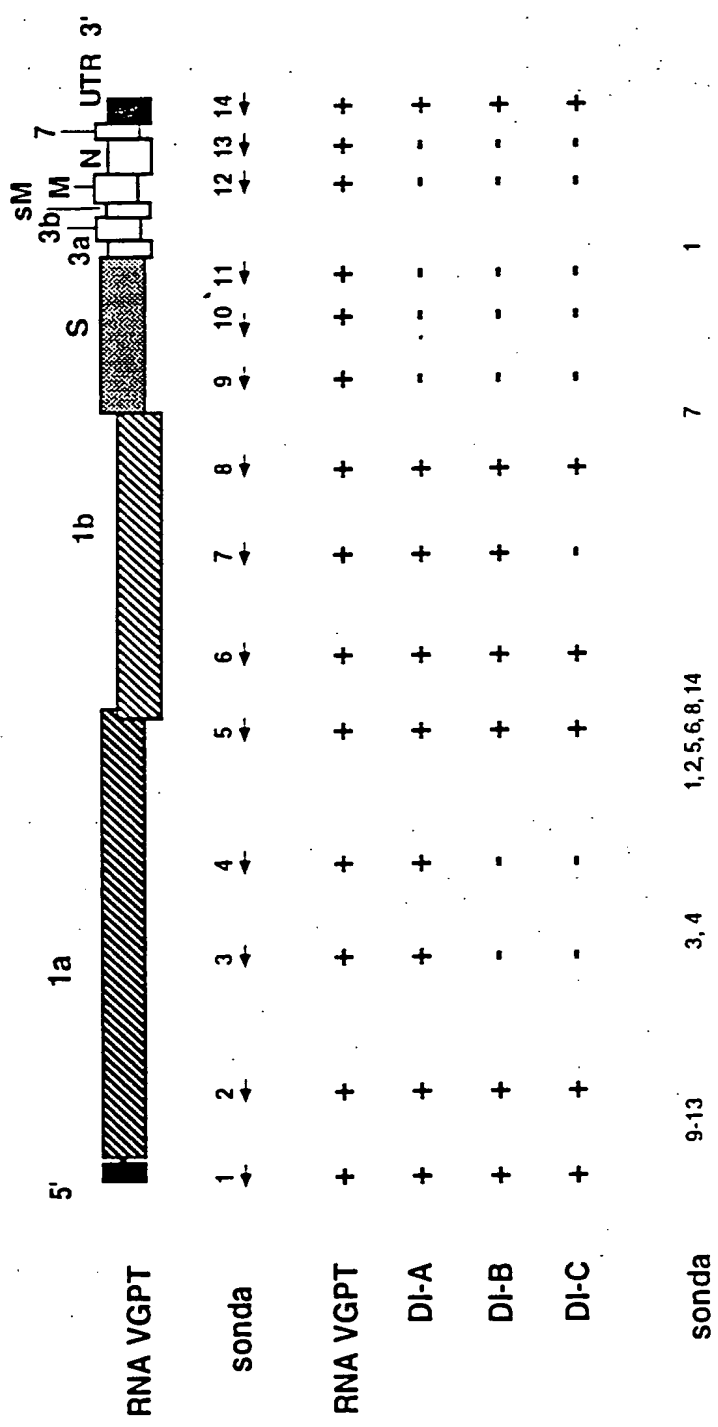


FIGURA 16

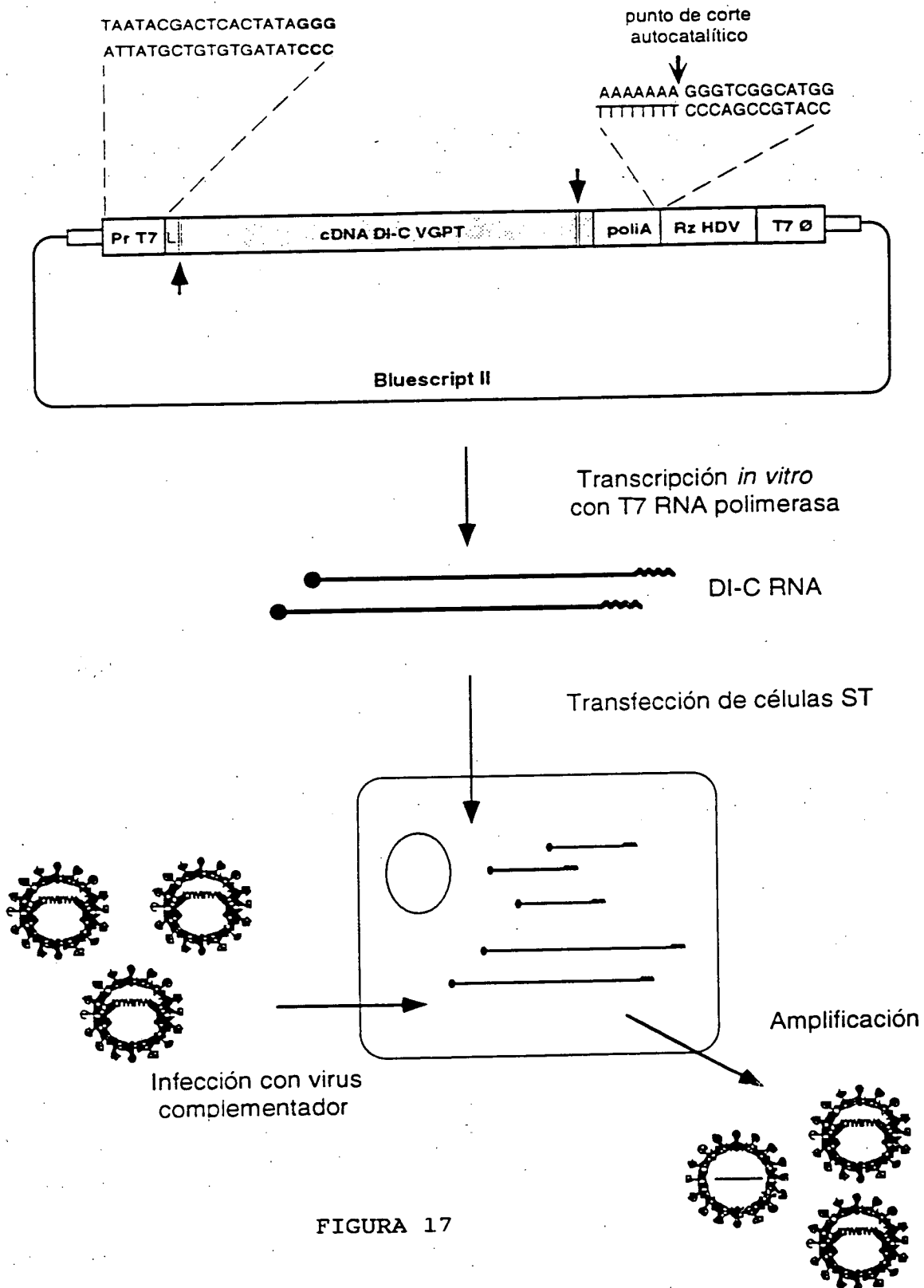


FIGURA 17